

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais**

**Cátia da Cruz Santos**

**ELETROSSÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES POLIMÉRICOS  
APLICADOS AO DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSSENSOR PARA  
DIAGNÓSTICO DE DENGUE**

**Diamantina-MG**

**2019**



**Cátia da Cruz Santos**

**ELETROSSÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES POLIMÉRICOS  
APLICADOS AO DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSSENSOR PARA  
DIAGNÓSTICO DE DENGUE**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais (PPGMQ-MG) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri como requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Franco Ferreira

Coorientador: Prof. Dr. Ronaldo Luis Thomasini

**Diamantina-MG**

**2019**

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM  
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

S237e

Santos, Cátia da Cruz

Eletrossíntese e caracterização de filmes poliméricos aplicados ao desenvolvimento de um imunossensor para diagnóstico de Dengue / Cátia da Cruz Santos, 2019.

155 p. : il.

Orientador: Lucas Franco Ferreira

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

1. Filmes poliméricos. 2. Eletrodos modificados. 3. Mecanismo de polimerização. 4. Antígeno rNS1. 5. Imunossensores. I. Ferreira, Lucas Franco. II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

**CDD 541.37**

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

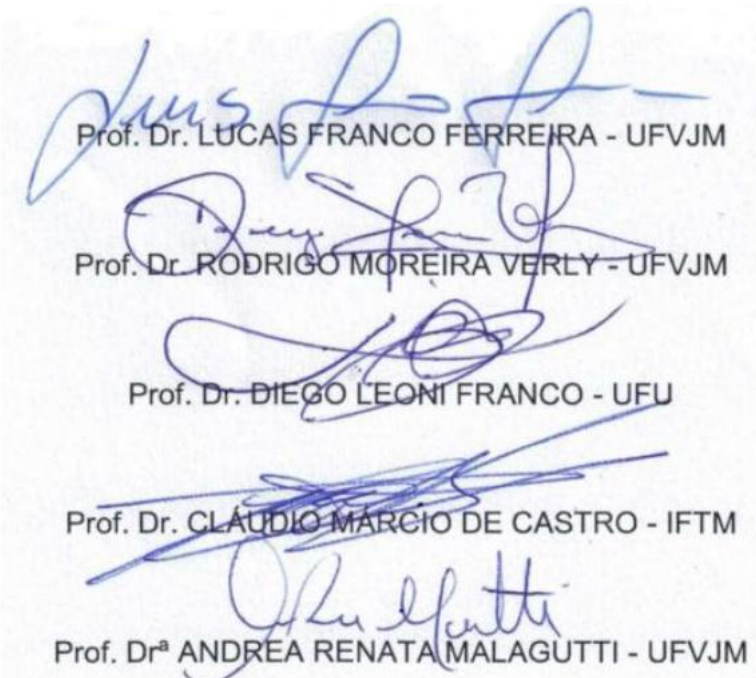
CÁTIA DA CRUZ SANTOS

**ELETROSSÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES POLIMÉRICOS  
APLICADOS AO DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSSENSOR PARA  
DIAGNÓSTICO DE DENGUE**

Tese apresentada ao DOUTORADO  
MULTICÊNTRICO EM QUÍMICA, nível de  
DOUTORADO, como parte dos requisitos para  
obtenção do título de DOUTORA EM  
QUÍMICA.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Franco Ferreira

Data da aprovação: 02/08/2019



Prof. Dr. LUCAS FRANCO FERREIRA - UFVJM

Prof. Dr. RODRIGO MOREIRA VERLY - UFVJM

Prof. Dr. DIEGO LEONI FRANCO - UFU

Prof. Dr. CLÁUDIO MARCIO DE CASTRO - IFTM

Prof. Dr<sup>a</sup> ANDREA RENATA MALAGUTTI - UFVJM

DIAMANTINA



## AGRADECIMENTOS

*A Deus,*

Autor da vida, dono de toda ciência e sabedoria, por me permitir concluir mais esta etapa em minha vida e por nunca me deixar só.

*Aos meus pais Fenilza e Carleno,*

Por tudo o que sou, pelo amor infinito, pelo apoio constante, orações, por toda dedicação e compreensão em todos os momentos. Eu amo vocês!

*Às minhas irmãs Cássia e Carla,*

Pelo carinho, amizade e apoio, por sempre desejarem o melhor para mim e ficarem felizes com as minhas vitórias. Amo vocês até a eternidade!

*Ao meu esposo Gustavo,*

Pelo amor, companheirismo, incentivo, cuidado e compreensão em todo o tempo. Te amo!

*Ao meu orientador Prof. Dr. Lucas Franco Ferreira,*

Pelo profissionalismo, orientação, paciência e pela disponibilidade durante a realização deste trabalho. Agradeço a confiança e amizade durante todo este tempo.

*Ao meu coorientador Prof. Dr. Ronaldo Luis Thomasini,*

Pelas amostras cedidas, pela colaboração e sugestões que contribuíram para a execução deste trabalho.

*Ao meu amigo Thiago Coimbra,*

Pelos momentos de alegria com o seu jeito divertido e espontâneo. E por me ajudar sempre que precisei.

*Ao Grupo de Eletroquímica e Nanotecnologia Aplicada (GENAp),*

Pelo companheirismo, por toda ajuda e troca de conhecimentos.

*Ao Labvale,*

Em especial ao Teles e Lindomar, pela amizade e companheirismo nos estudos.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e contribuições que aperfeiçoaram este trabalho.

A UFVJM, pela oportunidade de realização deste trabalho, pela bolsa concedida e pelos anos de formação profissional.

Aos familiares e amigos...

*Muito obrigada a todos!*





*“Confie no Senhor de todo o coração e não se apoie na sua própria inteligência. Lembre-se de Deus em tudo o que fizer, e Ele lhe mostrará o caminho certo”*

*(Provérbios 3.5-6)*



## RESUMO

A infecção pelo vírus da Dengue constitui-se em uma das doenças mais negligenciadas e de maior importância para a saúde pública no mundo. É uma doença de amplo espectro clínico, incluindo desde formas brandas até quadros graves, causada por diferentes sorotipos do vírus. Não existe tratamento específico para a Dengue. No entanto, a detecção precoce e o acesso a cuidados médicos adequados reduzem as taxas de mortalidade para abaixo de 1%. Novos métodos de diagnóstico da doença têm sido estudados através da imobilização da proteína não-estrutural 1 (NS1) do vírus dengue, por esta ser um marcador utilizado durante a fase aguda da doença. Para isso, imunossensores utilizando a detecção eletroquímica têm sido explorados em várias análises, uma vez que são específicos, simples, portáteis e geralmente descartáveis e podem realizar a detecção *in situ* ou automatizada. Neste trabalho, realizou-se a síntese eletroquímica de filmes poliméricos derivados do ácido 4-aminobenzóico (4-ABA), 4-aminobenzamida (4-ABZ), ácido 4-hidroxibenzóico (4-HBA) e 4-hidroxibenzamida (4-HBZ) na superfície de eletrodos de grafite através da voltametria cíclica (VC). Posteriormente, foi proposto um mecanismo de eletropolimerização para os polímeros obtidos. As propriedades eletroquímicas, morfológicas e estruturais dos filmes poliméricos formados e suas aplicações na imobilização de biomoléculas foram investigadas. Desta forma, verificou-se que os eletrodos modificados com poli(4-ABA) e poli(4-HBA) foram mais eficazes na imobilização da proteína recombinante não estrutural 1 (rNS1) e de anticorpos anti-NS1. Na segunda parte deste trabalho, um novo imunossensor eletroquímico baseado em anticorpos específicos anti-NS1 acoplados a eletrodos impressos de grafite modificados com poli(4-ABA) foi desenvolvido com sucesso para o diagnóstico do vírus da Dengue. A análise de validação foi realizada com amostras de soro humano, onde após os testes sorológicos (ELISA), diferentes soros foram testados pelo teste rápido da Bioclin, e os diagnósticos foram confirmados pelo método impedimétrico utilizado neste trabalho. Os resultados obtidos foram todos positivos para a metodologia imunocromatográfica utilizada no teste rápido e para a detecção impedimétrica de anticorpos anti-NS1. A comparação entre os resultados mostra que o dispositivo fabricado pode ser aplicado satisfatoriamente para o diagnóstico preciso do vírus da Dengue, apresentando excelentes resultados, sendo assim, uma nova alternativa de detecção da Dengue.

**Palavras-chave:** Filmes poliméricos, eletrodos modificados, mecanismo de polimerização, antígeno rNS1, imunossensores.



## ABSTRACT

Dengue virus infection is one of the most neglected diseases of major importance to public health in the world. It is a disease of wide clinical spectrum, including from soft forms to severe frames, caused by different serotypes of the virus. There is no specific treatment for Dengue. However, early detection and access to adequate medical care reduce mortality rates to below 1%. New methods of diagnosis of the disease have been studied through the immobilization of dengue virus nonstructural protein 1 (NS1), as a marker used during the acute phase of the disease. For this purpose, immunoassays using electrochemical detection have been explored in several analyzes, since they are specific, simple, portable and generally disposable and can perform *in situ* or automated detection. In this work, the electrochemical synthesis of polymeric films derived from 4-aminobenzoic acid (4-ABA), 4-aminobenzamide (4-ABZ), 4-hydroxybenzoic acid (4-HBA) and 4-hydroxybenzamide (4-HBZ) on the surface of graphite electrodes through cyclic voltammetry (VC). Subsequently, an electropolymerization mechanism was proposed for the obtained polymers. The electrochemical, morphological and structural properties of the polymeric films formed and their applications in the immobilization of biomolecules were investigated. In this way, electrodes modified with poly(4-ABA) and poly(4-HBA) were found to be more effective immobilization of the non-structural recombinant protein 1 (rNS1) and anti-NS1 antibodies. In the second part of this work, a new electrochemical immunosensor based on specific anti-NS1 antibodies coupled to poly(4-ABA) modified graphite printed electrodes has been successfully developed for the diagnosis of Dengue virus. Validation analysis was carried with human serum samples, where after the serological tests (ELISA), different sera were tested by the Bioclin rapid test, and the diagnoses were confirmed through the impedimetric method used in this work. The results obtained were all positive for the immunochromatographic methodology used in the rapid test and for the impedimetric detection of anti-NS1 antibodies. The comparison between the results shows that the manufactured device can be applied satisfactorily for the precise diagnosis of the Dengue virus, presenting excellent results, thus being a new alternative for the detection of Dengue specific antibodies.

**Keywords:** Polymeric films, modified electrodes, polymerization mechanism, rNS1 antigen, immunosensors.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Número de casos de Dengue no Brasil no período de 2000 a 2019*. .....	33
<b>Figura 2:</b> Estrutura cristalina de um dímero da proteína não estrutural NS1 do vírus da Dengue. ....	37
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática do genoma do vírus da Dengue. ....	37
<b>Figura 4:</b> Níveis de anticorpos e antígeno NS1 durante as respostas primária e secundária aos vírus da Dengue. ....	40
<b>Figura 5:</b> Esquema simplificado para o sistema de seletividade de anticorpos.....	47
<b>Figura 6:</b> Oxidações do polipirrol e a formação de pólarons e bipólarons. ....	57
 <b>CAPÍTULO 1 - ELETROPOLIMERIZAÇÃO DE DERIVADOS DE FENOL E ANILINA: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO COMO TRANSDUTORES ELETROQUÍMICOS</b>	
<b>Figura 1:</b> Estruturas químicas dos monômeros investigados. A) ácido 4-aminobenzóico (4-ABA), B) 4-aminobenzamida (4-ABZ), C) ácido 4-hidroxibenzóico (4-HBA) e D) 4-hidroxibenzamida (4- HBZ). ....	89
<b>Figura 2:</b> VCs registrados em solução de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 M contendo 2,5 mM de solução de (A) 4-ABA, (B) 4-ABZ, (C) 4-HBA e (D) 4-HBZ sobre EG. Número de ciclos = 100; $\nu = 50$ mV/s. (---) 1º ciclo de potencial. As setas indicam a direção da corrente.....	95
<b>Figura 3:</b> Imagens de MEV em ampliação de 50.000x para (A) poli(4-ABA), (B) poli(4-ABZ), (C); poli(4-HBA); (D) poli(4-HBZ) e (E) EG. ....	97
<b>Figura 4:</b> Espectros de FTIR para os monômeros: (A) 4-ABA, (B) 4-ABZ, (C) 4-HBA, (D) 4-HBZ e seus respectivos polímeros: (E) poli(4-ABA), (F) poli(4-ABZ), (G) poli(4-HBA) e (H) poli(4-HBZ). ....	98

**Figura 5:** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  para os monômeros: (A) 4-ABA, (B) 4-ABZ, (C) 4-HBA, (D) 4-HBZ e seus respectivos polímeros: (E) poli(4-ABA), (F) poli(4-ABZ), (G) poli(4-HBA) e (H) poli(4-HBZ). 100

**Figura 6:** Produtos propostos obtidos a partir da eletropolimerização de (A) poli(4-ABA), (B) poli(4-ABZ), (C) poli(4-HBA) e (D) poli(4-HBZ). 101

**Figura 7:** Mecanismo genérico proposto para eletropolimerização do 4-ABA, 4-ABZ, 4-HBA e 4-HBZ. 103

**Figura 8:** A) VCs registrados em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 M após a eletropolimerização do (---) EG, (a) poli(4-ABA)/EG, (b) poli(4-ABZ)/EG, (c) poli(4-HBA)/EG e (d) poli(4-HBZ)/EG.  $\nu = 100$  mV/s. B) Estruturas propostas para as formas oxidadas e reduzidas dos filmes poliméricos. 104

**Figura 9:** VCs registrados em (A)  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  5,0 mM contendo KCl 0,1 M e (B) em KCl 0,1 M; (C)  $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_2/\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  5,0 mM contendo KCl 0,1 M e (D) em KCl 0,1 M sobre EG e EG modificado.  $\nu = 100$  mV/s. Sendo: (---) EG, (a) poli(4-ABA)/EG, (b) poli(4-ABZ)/EG, (c) poli(4-HBA)/EG e (d) poli(4-HBZ)/EG. 106

**Figura 10:**  $R_{ct}$  em função de: (A) concentração de rNS1, (B) diluição de soro, (C) volume de amostra e (D) temperatura. 108

**Figura 11:** Diagrama de Nyquist de EIE obtido em  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  contendo KCl 0,10 M para: A) poli(4-ABA), B) poli(4-ABZ), C) poli(4-HBA) e D) poli(4-HBZ). Onde: (o) = Ag (antígeno); ( $\square$ ) = Ag-Ac $^-$  (interação do antígeno com anticorpo negativo) e ( $\Delta$ ) = Ag-Ac $^+$  (interação do antígeno com anticorpo positivo). [rNS1] = 100,0  $\mu\text{g/mL}$ . Diluição dos soros: 1/250. Amplitude: 10 mV. Faixa de frequência: 100 kHz a 10 mHz. As linhas sólidas representam a simulação de dados experimentais para um circuito equivalente. Inserção: regiões de alta frequência. 108



## CAPÍTULO 2 - UMA NOVA FERRAMENTA PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO POR VÍRUS DA DENGUE: OTIMIZAÇÃO E DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-NS1 EM AMOSTRAS DE SORO POR TRANSDUTORES IMPEDIMÉTRICOS

**Figura 1:** VCs obtidos para os EIG em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 M contendo 2,5 mM de: (A) 4-ABA, (B) 4-ABZ, (C) 4-HBA e (D) 4-HBZ. Ciclos = 10;  $\nu$  = 50 mV/s. .... 131

**Figura 2:** Diagrama de Nyquist obtido em  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  5,0 mM contendo KCl 0,10 M para: A) poli(4-ABA)/EIG, B) poli(4-ABZ)/EIG, C) poli(4-HBA)/EIG, D) poli(4-HBZ)/EIG e E) EIG. Onde: (o) = Ag (antígeno); ( $\square$ ) = Ag- $\text{Ac}^-$  (interação antígeno com amostra não específica) e ( $\Delta$ ) = Ag- $\text{Ac}^+$  (interação antígeno com anticorpo específico). [rNS1] = 1,0 ng/mL. Diluição dos soros: 1/250. Amplitude: 10 mV. Faixa de frequência: 100 kHz a 10 mHz. As linhas sólidas representam a simulação de dados experimentais utilizando-se um circuito equivalente de Randles (F). .... 133

**Figura 3:** Dot blot de soros positivos e negativos de camundongos na diluição de 1:1000 revelados com 3,3'-diaminobenzidina/peróxido de hidrogênio..... 135

**Figura 4:** A) VCs em  $\nu$  = 100 mV/s e B) Diagramas de Nyquist obtidos em  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  5,0 mM contendo KCl 0,10 M para: (a) EIG, (b) poli(4-ABA)/EIG, (c) rNS1/poli(4-ABA)/EIG, (d) BSA/rNS1/poli(4-ABA)/EIG, (e)  $\text{Ac}^+$ /rNS1/poli(4-ABA)/EIG e (f)  $\text{Ac}^+$ /BSA/rNS1/poli(4-ABA)/EIG. .... 136

**Figura 5:**  $\Delta R_{ct}$  em função de: (A) número de ciclos de potencial, (B) velocidade de varredura, (C) concentração de rNS1, (D) tempo de incubação de rNS1, (E) tempo de incubação do BSA e (F) tempo de reação com  $\text{Ac}^+$ . .... 138

**Figura 6:** (A) Valores de  $R_{ct}$  obtidos pelo imunossensor para amostras de soro de camundongos contendo anticorpos específicos e amostras inespecíficas. (B)  $R_{ct}$  em função do fator de diluição dos soros positivos de camundongos. .... 140

**Figura 7:** (A) Análise dos interferentes: ácido úrico, glicose, água e tampão HBS-EP em comparação às amostras de soro específicas da dengue. (B) Variação dos valores de  $R_{ct}$  do BSA/rNS1/poli(4-ABA)/EIG armazenado a 4,0 °C durante 45 dias. .... 142

**Figura 8:** (A) Resposta do imunossensor em relação à reação com amostras de sangue não específicas. (B) Resposta do imunossensor em relação à reação com amostras de soro de coelhos imunizados com os quatro sorotipos da Dengue. .... 143

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 1 - ELETROPOLIMERIZAÇÃO DE DERIVADOS DE FENOL E ANILINA: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO COMO TRANSDUTORES ELETROQUÍMICOS**

**Tabela 1:** Parâmetros investigados para construção do imunossensor.....94

**Tabela 2:** Valores de  $R_{ct}$  obtidos da simulação de EIE para o imunossensor e reação com anticorpos positivos e negativos para Dengue ( $n = 3$ )..... 109

### **CAPÍTULO 2 - UMA NOVA FERRAMENTA PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO POR VÍRUS DA DENGUE: OTIMIZAÇÃO E DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-NS1 EM AMOSTRAS DE SORO POR TRANSDUTORES IMPEDIMÉTRICOS**

**Tabela 1:** Valores de  $R_{ct}$  ( $\Omega$ ) obtidos a partir da simulação de EIE para o EIG e os eletrodos modificados com a rNS1 (Ag), assim como para a interação do imunossensor com anticorpos específicos ( $Ac^+$ ) e amostras inespecíficas ( $Ac^-$ ).. ..... 134

**Tabela 2:** Valores da corrente de pico obtidos por VC e  $R_{ct}$  obtidos por EIE em cada etapa de construção do imunossensor..... 137

**Tabela 3:** Valores de  $R_{ct}$  ( $\Omega$ ) obtidos a partir dos resultados de simulação de EIE para as diluições do soro positivo e negativo e os valores de  $\Delta R_{ct}$ ..... 141

**Tabela 4:** Dados de comparação do desempenho de imunossensores eletroquímicos baseados em NS1 para o diagnóstico de Dengue relatados na literatura. .... 145



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-ABA	Ácido 4-aminobenzóico
4-HBA	Ácido 4-hidroxibenzóico
4-ABZ	4-aminobenzamida
4-HBZ	4-hidroxibenzamida
Ac	Anticorpos
Ag	Antígenos
BSA	Albumina de soro bovino, do inglês, <i>Bovine serum albumin</i>
C <sub>dl</sub>	Capacitância da dupla camada
DENV	Vírus da dengue
DC	Dengue clássica
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i>
FHD	Febre hemorrágica da dengue
EIE	Espectroscopia de impedância eletroquímica
EG	Eletrodo de grafite
EIG	Eletrodo impresso de grafite
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimática, do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
$E_{pa}$	Potencial de pico anódico
$E_{pc}$	Potencial de pico catódico
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, do inglês, <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobina G
IgM	Imunoglobina M
$I_{pa}$	Corrente de pico anódica
$I_{pc}$	Corrente de pico catódico
kb	Kilobase
kDa	Kilo Daltons
M	Molar
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
min	Minutos
mL	Mililitros

MS	Ministério da Saúde
mV/s	Milivolts por segundo
nm	Nanômetros
NS1	Proteína não estrutural do vírus da Dengue, do inglês, <i>non-structural protein 1</i>
OCP	Potencial de circuito aberto, do inglês <i>open circuit potencial</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>
Poli(4-ABA)	Polímero derivado do ácido 4- aminobenzóico
Poli(4-HBA)	Polímero derivado do ácido 4- hidroxibenzóico
Poli(4-ABZ)	Polímero derivado da 4- aminobenzamida
Poli(4-HBZ)	Polímero derivado da 4- hidroxibenzamida
R <sub>ct</sub>	Resistência a transferência de carga
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês, <i>Ribonucleic acid</i>
rNS1	Proteína recombinante não estrutural do vírus da Dengue, do inglês, <i>recombinant non-structural protein 1</i>
s	Segundos
SCD	Síndrome do choque da dengue
SE	Semana epidemiológica
V	Volts
VC	Voltametria cíclica
VPD	Voltametria de pulso diferencial
W	Impedância de Warburg
Z'	Componente real de impedância (resistiva)
Z''	Componente imaginária de impedância (capacitiva)
$\Delta E_p$	Diferença entre os potenciais de pico
$\mu$	Micro
v	Velocidade de varredura

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>27</b>
2.1 – Dengue .....	27
2.1.1 – Agente etiológico .....	29
2.1.2 – Histórico: aspectos epidemiológicos no mundo e no Brasil .....	31
2.1.3 – Proteína NS1 .....	36
2.1.4 – Diagnósticos laboratoriais.....	38
2.2 – Biossensores .....	42
2.2.1 – Técnicas de imobilização .....	43
2.2.2 – Classificação dos biossensores .....	45
2.3 – Imunossensores.....	46
2.3.1 – Princípios básicos dos imunossensores.....	46
2.3.2 – Imunossensores impedimétricos .....	49
2.3.2.1 – Espectroscopia de impedância eletroquímica .....	50
2.3.3 – Imunossensores para o diagnóstico de Dengue .....	51
2.4 – Aplicação de polímeros condutores em biossensores.....	53
2.5 – Polímeros condutores.....	54
2.5.1 – Dopagem de polímeros condutores.....	56
2.5.2 – Obtenção de polímeros condutores por eletropolimerização.....	58
2.5.3 – Aplicação dos polímeros condutores .....	60
2.5.4 – Eletrodos quimicamente modificados com polímeros .....	61
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>65</b>
 <b>CAPÍTULO 1 - ELETROPOLIMERIZAÇÃO DE DERIVADOS DE FENOL E ANILINA: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO COMO TRANSDUTORES ELETROQUÍMICOS .....</b>	 <b>83</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>83</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>85</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>87</b>
<b>2. METODOLOGIA.....</b>	<b>91</b>
2.1 – Reagentes .....	91

2.2 – Equipamentos .....	91
2.3 – Eletropolimerização .....	92
2.4 – Caracterização morfológica.....	92
2.5 – Caracterização estrutural .....	92
2.6 – Caracterização eletroquímica .....	93
2.7 – Imunossensor impedimétrico .....	94
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>95</b>
3.1 - Caracterização eletroquímica de transdutores baseados em filmes poliméricos .	95
3.2 – Análises de MEV .....	96
3.3 – Caracterização da plataforma por FTIR e RMN de <sup>1</sup> H .....	97
3.4 – Mecanismo proposto de eletropolimerização.....	102
3.5 – Caracterização eletroquímica .....	104
3.6 – Imobilização do antígeno rNS1 e detecção de anticorpos anti-NS1 .....	107
<b>4. CONCLUSÃO .....</b>	<b>111</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>113</b>

<b>CAPÍTULO 2 - UMA NOVA FERRAMENTA PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO POR VÍRUS DA DENGUE: OTIMIZAÇÃO E DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-NS1 EM AMOSTRAS DE SORO POR TRANSDUTORES IMPEDIMÉTRICOS .....</b>	<b>117</b>
--	------------

<b>RESUMO .....</b>	<b>117</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>119</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>121</b>
<b>2. METODOLOGIA .....</b>	<b>125</b>
2.1 – Materiais.....	125
2.2 – Produção da rNS1 e amostras de soros .....	125
2.3 – Formação dos filmes poliméricos .....	126
2.4 – Análise dot blot .....	126
2.5 – Construção do imunossensor impedimétrico .....	127
2.6 – Estudos de otimização do imunossensor.....	128
2.7 – Estudos de interferentes, estabilidade, reprodutibilidade, repetibilidade e validação.....	129
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>131</b>



3.1 - Caracterização eletroquímica de transdutores .....	131
3.2 – Comportamento eletroquímico dos transdutores na imobilização da rNS1 e reconhecimento de anticorpos específicos e reações inespecíficas .....	132
3.3 – Caracterização das amostras de soro de camundongos por dot blot.....	135
3.4 – Caracterização eletroquímica do imunossensor.....	136
3.5 – Estudos de otimização .....	137
3.6 – Desempenho analítico do imunossensor.....	139
3.7 – Estudos de seletividade, estabilidade e reprodutibilidade .....	141
3.8 – Análise de espécimes biológicos .....	143
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>147</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>149</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>153</b>



## 1. INTRODUÇÃO

A incidência da Dengue cresceu drasticamente em todo o mundo nas últimas décadas. Segundo a Organização Mundial da Saúde, a dengue está na lista das 10 principais ameaças à saúde em 2019. Estima-se que 40% de todo o mundo está em risco de contrair o vírus da Dengue, sendo cerca de 390 milhões de infecções de Dengue por ano. Em vista disso, é muito importante o diagnóstico precoce da doença, uma vez que esta pode ser fatal. Diagnosticar a Dengue em um tempo curto serve para minimizar epidemias e o aumento da taxa de mortalidade da população devido à doença. As medidas de controle atuais têm por objetivo eliminar o vetor transmissor da Dengue, porém, de modo geral, a efetividade dessas intervenções tem sido muito baixa, não conseguindo conter a disseminação do vírus e, consequentemente, as epidemias se sucedem.

Atualmente, ainda não há tratamento específico contra a Dengue. Uma forma de prevenção contra esta doença seria a utilização de uma vacina eficaz, tetravalente e segura que fornecesse imunidade simultânea e duradoura para os quatro sorotipos virais presentes no Brasil. Embora várias linhas de pesquisa para isso estejam em andamento, nenhuma delas em fase de uso populacional. Assim, como não há uma vacina licenciada disponível, a prevenção está atualmente limitada às medidas de controle de vetores.

O diagnóstico da Dengue pode ser realizado por uma variedade de métodos, mas nenhuma técnica única que detecta os estágios agudo e de recuperação da doença está disponível. De acordo com o Ministério da Saúde, a confirmação do diagnóstico pode ser feita por meio de testes sorológicos ou de detecção viral. Contudo, estes métodos apresentam algumas limitações, tornando o diagnóstico demorado e impreciso. Além disso, existe ainda a dificuldade em relação aos primeiros sintomas da Dengue, que podem muitas vezes ser confundidos com os de outras doenças, e desta forma, um diagnóstico precoce da doença se torna difícil quando baseado apenas em aspectos clínicos. Portanto, é urgentemente indispensável o desenvolvimento de um método rápido e confiável, no qual seja possível uma confirmação prévia da infecção pelo vírus da Dengue logo após o início dos sintomas.

Neste cenário, novas técnicas e metodologias baseadas em biossensores para a detecção de Dengue têm sido desenvolvidas, com o objetivo de construir dispositivos de diagnósticos automatizados e portáteis. Algumas destas abordagens relatadas na literatura fornecem potencial para aplicações clínicas, sendo que a maioria se baseia na detecção direta da proteína não estrutural 1 (NS1) para o diagnóstico da Dengue. Consequentemente, já existem muitos trabalhos sobre o mesmo assunto reportados na literatura, de forma que este trabalho

traz uma proposta diferente para fornecer o diagnóstico da Dengue: desenvolver um imunossensor eletroquímico baseado na imobilização da proteína recombinante não estrutural 1 (rNS1) para a detecção de anticorpos anti-NS1 específicos da Dengue.

A NS1 é uma glicoproteína altamente conservada que está presente em altas concentrações no soro de pacientes infectados pelo vírus da Dengue desde o início dos sintomas, neste caso, ela se encontra na forma nativa, enquanto a forma recombinante refere-se à proteína produzida em laboratório. Desta forma, a associação da proteína NS1 com dispositivos como os biossensores pode se tornar um método alternativo e eficiente no diagnóstico da Dengue comparado aos métodos existentes, pois a imobilização da proteína recombinante não estrutural 1 (rNS1) permite detectar os anticorpos da doença, através do monitoramento da interação antígeno-anticorpo, resultante da reação. Além disso, os biossensores apresentam diversas vantagens como simplicidade, respostas rápidas, miniaturização mais fácil do sistema e podem permitir o monitoramento no local.

Neste contexto, os polímeros condutores têm atraído muito interesse como matrizes para a imobilização de biomoléculas, uma vez que podem servir como intermediários nos processos de interação entre o receptor e o analito e na transdução do sinal, com o objetivo de melhorar o tempo de resposta, a sensibilidade e o limite de detecção de biossensores para diversas aplicações, como o diagnóstico de doenças. Desta forma, polímeros funcionalizados estão, assim, encontrando uso cada vez maior em diagnósticos clínicos. O uso de polímeros condutores cresceu significativamente na ciência e tecnologia de sensores e biossensores devido à muitas vantagens tais como sua disponibilidade, diversidade, facilidade de síntese, modificação e de processamento e possibilidade de imobilização de diferentes espécies por diversas rotas. Com o intuito de aperfeiçoar esses dispositivos, a modificação da superfície de eletrodos com filmes poliméricos tem sido muito estudada.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi eletrossintetizar, caracterizar e desenvolver transdutores eletroquímicos a base de filmes poliméricos derivados do ácido 4-aminobenzóico (4-ABA), 4-aminobenzamida (4-ABZ), ácido 4-hidroxibenzóico (4-HBA) e 4-hidroxibenzamida (4-HBZ). Tais plataformas foram aplicadas na construção de um imunossensor para o diagnóstico da Dengue através da imobilização da proteína rNS1. Estudos de otimização, validação, estabilidade e interferentes foram realizados.

Para melhor compreensão dos resultados o trabalho foi então dividido em três partes, sendo a primeira relacionada a um referencial teórico e as outras duas na forma de artigos científicos (capítulos) submetidos ao *Journal of Electroanalytical Chemistry*.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 – Dengue

A dengue é classificada como a arbovirose mais importante do planeta, uma vez que ela é considerada a doença que mais acomete o ser humano na atualidade. O vírus da dengue é um arbovírus (transmitido por artrópodes), mosquitos do gênero *Aedes* (SOLOMON e MALLEWA, 2001). No atual contexto epidemiológico brasileiro, os arbovírus de maior circulação são o da dengue (DENV), chikungunya (CHIKV) e zika (ZIKV), além do vírus da febre amarela e de outros arbovírus com potencial de disseminação no país (LOPES, NOZAWA e LINHARES, 2014).

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor da dengue. O vírus é transmitido aos seres humanos através das picadas de mosquitos infectados. Após a incubação do vírus, um mosquito infectado é capaz de transmitir o vírus pelo resto da vida. O *Aedes aegypti* está presente em toda a região tropical e subtropical do mundo, predominando em áreas mais quentes e abundantes em água. É uma espécie exclusiva das zonas urbanas, pois as condições do meio ambiente favorecem seu desenvolvimento e proliferação (TAUIL, 2002).

A dengue é considerada como uma das doenças de maior impacto na saúde pública em todo o mundo, uma vez que ela ocorre nos centros urbanos de forma epidêmica, além de ser endêmica em várias regiões do mundo (GUY, SAVILLE, LANG *et al.*, 2011). Suas características epidemiológicas e fisiopatológicas dificultam o controle deste grave problema que acomete toda a população (BARRETO e TEIXEIRA, 2008; FERRAZ, BARNABÉ, QUONIAM *et al.*, 2018).

A dengue pode ser assintomática ou pode se manifestar tanto de forma branda, conhecida como dengue clássica (DC), ou de forma mais severa, conhecida como febre da dengue hemorrágica (FHD), podendo evoluir para a síndrome do choque da dengue (SCD) e até mesmo causar a morte (HALSTEAD, 1988).

Segundo o Ministério da Saúde (2002), os aspectos clínicos da dengue clássica são vários. A primeira manifestação é a febre alta, de início súbito, que varia de 39 a 40 °C, comumente seguida de forte dor de cabeça, dor atrás dos olhos, perda do paladar e apetite, tonturas, náuseas e vômitos, extremo cansaço, dores nos ossos e nas articulações, dores no corpo, manchas e erupções na pele. A doença tem duração de cinco a sete dias (máximo de 10 dias), mas o período de recuperação pode ser acompanhado de grande debilidade física (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

No que se refere à forma mais grave da doença, a febre hemorrágica da dengue, os sintomas iniciais são semelhantes aos da dengue clássica, porém há um agravamento do quadro no terceiro ou quarto dia de evolução, com aparecimento de manifestações hemorrágicas e colapso circulatório, caracterizados por febre alta, ocasionalmente de 40 a 41 °C, dores abdominais fortes e contínuas, vômitos persistentes, pele pálida, fria e úmida, manchas vermelhas na pele, sonolência, agitação e confusão mental, sede excessiva e boca seca, sangramento pela boca, nariz e gengiva. Muitas vezes, a doença avança para um estágio crítico porque ela é confundida com os sintomas de outras doenças, como uma gripe e tratada como tal. O que a diferencia são os sintomas respiratórios, estes que não são presentes no paciente com dengue, por isso o tratamento é iniciado antes de concluir o diagnóstico (CASTLEBERRY e MAHON, 2003; STEPHENSON, 2005). O extravasamento de plasma é a manifestação mais específica da febre hemorrágica da dengue, já que está presente apenas nesta forma clínica da doença, e é também o que põe em risco a vida do paciente, pois quando ocorre de forma muito intensa pode levar ao choque circulatório, que é de rápida instalação e se não for prontamente tratado pode levar ao óbito em 12 a 24 horas (WHO, 1997).

Nos casos em que a doença evolui para a síndrome do choque da dengue, o choque geralmente ocorre entre o terceiro e o sétimo dia da doença, geralmente precedido por dor abdominal. O choque é decorrente do aumento de permeabilidade vascular, seguida de hemoconcentração e falência circulatória (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). Alguns pacientes podem ainda apresentar manifestações neurológicas, como convulsões e irritabilidade. Além disso, condições prévias ou associadas como referência de dengue anterior, idosos, hipertensão arterial, diabetes, asma brônquica e outras doenças respiratórias crônicas graves podem constituir fatores capazes de favorecer a evolução com gravidade (CASTLEBERRY e MAHON, 2003).

A infecção primária da dengue causa um aumento de anticorpos IgM após 3 a 5 dias do início da febre. Estes anticorpos normalmente permanecem na circulação por 30 a 90 dias. Pacientes de regiões endêmicas podem apresentar infecções secundárias, que resultam em níveis elevados de anticorpos IgG, isoladamente ou simultaneamente com uma resposta de IgM. Desta forma, uma detecção específica de anticorpos IgM ou IgG pode ajudar a diferenciar uma infecção primária ou secundária (XAVIER, FREITAS, LOUREIRO *et al.*, 2014). Diversos casos estudados por Halstead (2003) relatou que a febre da dengue hemorrágica e a síndrome do choque da dengue são 15 a 80 vezes maior em infecções secundárias do que em infecções primárias e positivamente associadas a anticorpos preexistentes específicos para o vírus da dengue (HALSTEAD, 2003).

O vírus causador da doença possui quatro sorotipos, desta forma, após a infecção, a imunidade permanente é adquirida apenas para um mesmo sorotipo do vírus, sendo possível a ocorrência de reinfecções pelos outros sorotipos (MIAGOSTOVICH, SANTOS, FUMIAN *et al.*, 2006). Neste caso, um dos outros três sorotipos que ainda não teria contraído, poderá apresentar ou não uma forma mais grave. A maioria dos casos de dengue hemorrágica ocorrem em pessoas anteriormente infectadas por um dos quatro tipos de vírus (DONALISIO, FREITAS e VON ZUBEN, 2017).

### 2.1.1 – Agente etiológico

A dengue é uma doença infecciosa febril aguda causada por um vírus que pertence à família *Flaviviridae*, do gênero *flavivirus*. É um vírus composto por uma fita única de RNA de 11 kb de comprimento e apresenta-se como uma partícula esférica, com diâmetro de 40-50 nm, recoberta por um envelope de lipopolissacarídeo (HAMMON, RUNDNICK e SATHER, 1960).

O vírus da dengue (DENV) possui um envelope com material genético constituído de RNA, cujo genoma é composto de três genes de proteínas estruturais que codificam o nucleocapsídeo ou proteína do núcleo, e sete genes de proteínas não estruturais (NS) (GUZMAN, HALSTEAD, ARTSOB *et al.*, 2010). Este vírus apresenta quatro sorotipos antigenicamente distintos, denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, cada um gerando uma resposta imune do hospedeiro à infecção. Estes quatro sorotipos são geneticamente similares e compartilham aproximadamente 65% de seus genomas (HOLMES, 1998). Estes sorotipos formam um subgrupo no gênero *flavivirus*. Seu período de incubação é de 3 a 15 dias, com média de 5 a 6 dias (CUNHA, GUIMARÃES, SOUZA *et al.*, 2016). A proteção cruzada entre os sorotipos da dengue é apenas transitória, de forma que uma mesma pessoa pode apresentar a doença até quatro vezes ao longo da sua vida (DIAS, ALMEIDA, HAES *et al.*, 2010).

Os vírus da dengue são transmitidos pela fêmea do mosquito *Aedes aegypti*, quando esta também é infectada pelo vírus, que pode causar tanto a manifestação clássica da doença quanto à forma considerada hemorrágica (SOLOMON e MALLEWA, 2001). O vírus da dengue geralmente é ingerido pelo vetor, e então ele pode replicar-se durante 8 a 12 dias. Após ser infectado pelo vírus e decorrido o período de incubação viral, o mosquito é capaz de transmitir a infecção durante o resto de sua vida (LUPI, CARNEIRO e COELHO, 2007). A transmissão ocorre enquanto houver presença de vírus na circulação sanguínea do homem, chamado período

de viremia, sendo que esse período começa um dia antes do aparecimento da febre e vai até o sexto dia da doença. Com a multiplicação do vírus na corrente sanguínea, o indivíduo irá desenvolver os primeiros sintomas da dengue, geralmente, se manifestando após o terceiro dia da picada do mosquito (MASERA, SCHENKEL, DA SILVA *et al.*, 2011).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o *Aedes aegypti* é originário do Egito, tendo se espalhado por toda a África, de onde saiu em direção ao continente americano, principalmente através do tráfego marítimo. Posteriormente, se espalhou pelas regiões tropicais e subtropicais do planeta desde o século XVI. No Brasil, chegou durante o século XVIII, provavelmente nas embarcações que transportavam escravos, já que os ovos do mosquito podem resistir, sem estar em contato com a água, por até um ano. Com sua facilidade de se adaptar ao ambiente criado pelo homem, o *Aedes aegypti* tornou-se antropofílico, e estas características de adaptação permitiram que ele se tornasse abundante nas cidades e em outras áreas, o que aumentou sua competência vetorial, ou seja, a sua habilidade em tornar-se infectado por um vírus, replicá-lo e transmiti-lo (DYE, 1992).

Somente na década de 40 foi que ocorreu o isolamento do vírus da dengue, por Kimura em 1943, e Hotta em 1944. No ano seguinte, em 1945, Sabin e Schlesinger isolaram a cepa Havaí, quando o primeiro, neste mesmo ano, ao identificar outro vírus em Nova Guiné, observou que as cepas tinham características antigênicas diferentes e passou a considerar que eram sorotipos do mesmo vírus (TEIXEIRA, BARRETO e GUERRA, 1999). Às primeiras cepas ele denominou sorotipo 1 e às da Nova Guiné sorotipo 2. Em 1956, no curso da epidemia de dengue hemorrágica no Sudeste Asiático, foram isolados os vírus 3 e 4, definindo-se, a partir daí, que o complexo dengue é formado por quatro sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (MARTINEZ-TORRES, 1990). Estes vírus são sorologicamente relacionados, mas antigenicamente distintos, e têm sido isolados *in natura* de mosquitos do gênero *Aedes*, subgênero *Stegomyia*, espécies *aegypti*, *albopictus* e *polynesiensis* (TEIXEIRA, BARRETO e GUERRA, 1999).

Segundo Mustafa e colaboradores (2015), até o momento, acreditava-se que as infecções por dengue eram causadas por quatro sorotipos diferentes. A quinta variante DENV-5 foi isolada em outubro de 2013. O sorotipo segue o ciclo silvestre, diferentemente dos outros quatro sorotipos que acompanham o ciclo humano. A provável causa do surgimento do novo sorotipo pode ser a recombinação genética, a seleção natural e os gargalos genéticos. Não há indicação da presença de DENV-5 no Brasil (MUSTAFA, RASOTGI, JAIN *et al.*, 2015).



### 2.1.2 – Histórico: aspectos epidemiológicos no mundo e no Brasil

A dengue é um patógeno viral emergente de crescente importância global, infectando mais de 390 milhões de pessoas anualmente, dos quais aproximadamente 96 milhões se manifestam clinicamente, com qualquer gravidade da doença. Outro estudo sobre a prevalência da dengue estima que 3,9 bilhões de pessoas em 128 países estão em risco de infecção pelos vírus da doença. Durante o século XIX a dengue era considerada uma doença rara, mas atualmente ela está no *ranking* como a mais importante doença viral causada por mosquito do mundo, devido ao grande número de casos da doença (WHO, 2019).

Ao longo dos três últimos séculos, tem-se registrado a ocorrência de dengue em várias partes do mundo, com pandemias e epidemias isoladas, atingindo as Américas, a África, a Ásia e a Austrália. De acordo com Howe (1977), ocorreram no mundo oito pandemias, com duração de três a sete anos, no período compreendido entre 1779 e 1916. Antes de 1970, apenas 9 países tinham experimentado epidemias severas de dengue (HOWE, 1977).

Por um longo período a dengue foi considerada uma doença benigna e, somente após a Segunda Guerra Mundial, que favoreceu a circulação de vários sorotipos em uma mesma área geográfica, ocorreram surtos de uma febre hemorrágica severa que, posteriormente, seria identificada como uma forma da dengue. O primeiro destes eventos é descrito nas Filipinas, em 1953, sendo confundido com a febre amarela e com outras arboviroses e, só depois, em 1958, com a epidemia de Bangkok, Tailândia, a febre hemorrágica foi associada à dengue (MARTINEZ-TORRES, 1990).

Nas Américas, o vírus da dengue começou a circular desde o final do século XIX até as primeiras décadas do século XX, quando então houve um silêncio epidemiológico, registrando-se nos anos 60 a reintrodução dos sorotipos 2 e 3, associada à ocorrência de várias epidemias de dengue clássica. Em 1963, os primeiros casos relacionados ao DENV-3 foram detectados na Jamaica (TEIXEIRA, BARRETO e GUERRA, 1999).

O acontecimento epidemiológico mais relevante na história da febre hemorrágica da dengue e síndrome do choque da dengue nas Américas, ocorreu no ano de 1981 em Cuba, quando foram notificados 344.203 casos, com 116.143 hospitalizações. Dentre os 10.312 casos considerados graves, 158 resultaram em óbitos. O vírus DENV-2 foi associado a esta epidemia, que foi precedida por outra, causada pelo vírus DENV-1, em 1977 (KOURÍ, GUZMÁN e BRAVO, 1986). O segundo episódio mais grave de dengue ocorreu em 1989 na Venezuela, com um total de 8.619 casos e 117 óbitos, com isolamento dos vírus DENV-1, DENV-2 e DENV-4 (PINHEIRO, 1996).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2019), os casos de dengue nas Américas, no Sudeste Asiático e no Pacífico Ocidental ultrapassaram 1,2 milhão em 2008 e mais de 3,2 milhões em 2015. Já está bem documentada a dramática disseminação de dengue nas Américas nas últimas décadas, com 2,35 milhões de casos notificados em 2015, dos quais 10.200 casos foram diagnosticados como febre hemorrágica da dengue, causando 1.181 mortes. Já o ano de 2016 foi caracterizado por grandes surtos de dengue em todo o mundo, na região das Américas foram registrados mais de 2 milhões de casos, em que o Brasil contribuiu com quase 1,5 milhão de casos, número aproximadamente 3 vezes maior do que em 2014. Também foram notificados 1.032 óbitos. Em 2017, houve uma redução significativa no número de casos de dengue nas Américas - de 2.177.171 casos em 2016 para 584.263 casos em 2017. Isso representa uma redução de 73%. Após uma queda no número de casos em 2017 e 2018, um aumento acentuado nos casos está sendo observado em 2019 (WHO, 2019).

No Brasil, há relatos de epidemias de dengue desde 1846 até 1853, ocorridas em São Paulo e Rio de Janeiro. Mas a primeira epidemia documentada clínica e laboratorialmente ocorreu entre 1981-1982, quando foram isolados os sorotipos DENV-1 e DENV-4 em Boa Vista, Roraima, onde 11 mil pessoas foram infectadas pelo vírus da dengue. Em 1986-1987 uma epidemia de grandes proporções acometeu a cidade do Rio de Janeiro, quando o sorotipo DENV-1 foi reintroduzido no Brasil. A partir daí, novas epidemias ocorreram em diversos estados (DIAS, ALMEIDA, HAES *et al.*, 2010).

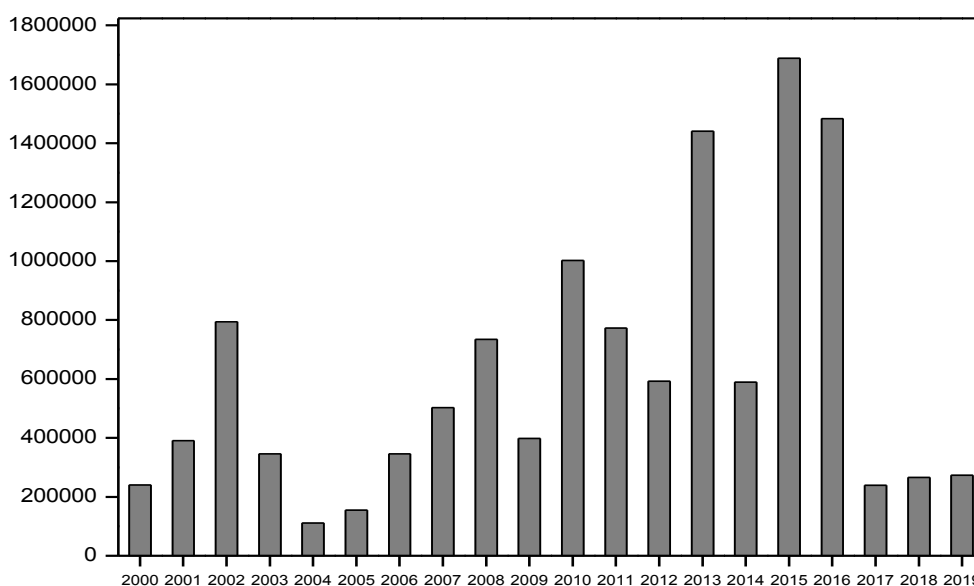
A introdução do DENV-2 no Rio de Janeiro em 1991 foi notificada pelos primeiros diagnósticos de febre hemorrágica da dengue no país, quando foram confirmados 462 casos e 8 óbitos (TEIXEIRA, COSTA, BARRETO *et al.*, 2005). Nos dois primeiros anos da década de 90, a dengue se manteve quase que inteiramente restrita a cidades dos estados do Rio de Janeiro, Ceará, Alagoas e Pernambuco. Nos anos subsequentes, a circulação viral (DENV-1 e DENV-2) se expandiu rapidamente para outras áreas do território brasileiro, acompanhando a expansão do seu mosquito vetor (TEIXEIRA, BARRETO e GUERRA, 1999).

No ano de 2001, foi confirmada a introdução do sorotipo DENV-3 no país (NOGUEIRA, SCHATZMAYR, DE FILIPPIS *et al.*, 2005). Este sorotipo foi responsável por uma das maiores incidências da doença no Brasil em 2002, com 794.219 casos notificados, ou seja, quase 80% das ocorrências do continente americano. Depois disso, houve diminuição significativa do número de casos da doença de 2003 a 2005, voltando a aumentar a partir de 2006, com 345.922 casos notificados. No período de 2003 até 2007, o DENV-3 foi o único sorotipo isolado. Contudo, a partir do mês de abril de 2007, houve a reintrodução do DENV-2 no país, sorotipo responsável pela epidemia no ano de 2008 com um total de 259.392 casos dos

734.384 casos notificados (BARRETO e TEIXEIRA, 2008). A Figura 1 mostra o número de casos notificados de dengue no Brasil entre o período de 2000 a 2019.

De acordo com o Ministério da Saúde (2010), na última década foram registrados cerca de 5 milhões de casos de dengue no Brasil, sendo quase 1 milhão de casos somente no ano de 2010, devido à reintrodução do sorotipo 4, que há 28 anos não circulava no Brasil. Este sorotipo foi isolado em Roraima, sendo proveniente da Venezuela, onde ele é endêmico há anos. Neste mesmo ano, somente até o início do mês de julho, foram notificados 789.055 casos de dengue no país, representando um aumento de mais de 150% em relação ao mesmo período de 2009. Deste total, 2.271 casos foram de febre hemorrágica da dengue com 367 óbitos. A região Sudeste foi a que notificou o maior número de casos (51,2%), seguida do Centro-Oeste (23,7%), Nordeste (11,3%), Norte (8,5%) e Sul (5,3%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

**Figura 1:** Número de casos de Dengue no Brasil no período de 2000 a 2019\*.



Fonte: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos> (\*Dados de 2019 até a SE 12).

O Brasil vem convivendo com epidemias de dengue há muitas décadas, mas uma das piores epidemias ocorreu em 2013, com a doença sendo relatada em mais de 100 países. Segundo o Ministério da Saúde, somente até o mês de fevereiro de 2013, já haviam sido notificados 204.650 casos de dengue no país, sendo 324 desses registros ocorrências graves da doença e 33 o número de óbitos. Em comparação ao mesmo período em 2012, o aumento de casos notificados foi de 190%, com as regiões Centro-Oeste e Sudeste do país liderando as

notificações (79% dos casos registrados no país). Em 2014, foram registrados 589.107 casos prováveis de dengue no país até a semana epidemiológica (SE) 53 (28/12/14 a 03/01/15).

Em 2014, o Brasil começou a adotar a nova classificação de casos de dengue da Organização Mundial da Saúde, sendo estes atualmente classificados como dengue, dengue com sinais de alarme e dengue grave e não mais dengue clássica, febre hemorrágica da dengue e síndrome do choque da dengue, respectivamente. Essa nova denominação se mostrou mais sensível para captar os casos graves e, com isso, contribui para melhorar o diagnóstico dos pacientes, para uma possível redução da letalidade por dengue e uma maior aproximação entre vigilância epidemiológica e assistência (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Nos últimos anos, os dados sobre a dengue continuaram alarmantes no país. Conforme mostra a Figura 1, no ano de 2015 foi registrado o maior número de casos notificados de dengue até o momento, com 986 óbitos confirmados. Segundo os dados do boletim epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde, em 2015, da SE 1 à SE 52, foram notificados 1.688.688 casos de dengue, e em 2016, 1.483.623. Até a SE 52 de 2016 foram confirmados 861 casos de dengue grave e 8.402 casos de dengue com sinais de alarme. No mesmo período de 2015, foram confirmados 1.714 casos de dengue grave e 21.693 casos de dengue com sinais de alarme, sendo que a região com maior número de casos confirmados de dengue grave e de dengue com sinais de alarme foi a região Sudeste, com 449 e 3.826 casos, respectivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Em 2017, houve uma redução nos casos notificados de dengue em relação aos anos anteriores. Entre a SE 1 e a SE 52, foram notificados 239.389 casos de dengue, sendo confirmados 321 casos de dengue grave e 3.616 casos de dengue com sinais de alarme. Em 2018, até a SE 52, foram notificados 265.934 casos de dengue no país, com 155 óbitos confirmados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

De acordo com o Ministério da Saúde (2019), neste ano, até a SE 12 (30/12/2018 a 23/03/2019), foram notificados 273.193 casos de dengue, sendo que a região Sudeste apresentou o maior número de casos prováveis de dengue (179.714 casos; 65,7%) em relação ao total do país. No mesmo período de 2018, foram registrados 71.525 casos prováveis de dengue. Entretanto, estes números aumentaram, até o dia 13 de abril de 2019, foram registrados 451.685 casos prováveis de dengue no Brasil, um aumento de 339,9% em relação ao mesmo período do ano passado, no qual 102.681 casos foram registrados. Neste ano, 65% dos casos registrados foram na região Sudeste, principalmente em Minas Gerais e São Paulo. Este aumento se deve provavelmente ao retorno do sorotipo 2 ao país, pois 85% dos casos avaliados eram do DENV-2, quando nos últimos anos não passavam de 5%, neste caso, os sorotipos 1 e

4 eram predominantes. Geralmente, quando há mudança do sorotipo circulante, há aumento dos casos de dengue (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Até a SE 29 (22/07/2019), foram notificados 453.750 casos de dengue em Minas Gerais, com 117 óbitos e 1.048 casos em Diamantina. A incidência da dengue é considerada muito alta em Diamantina que tem uma população de aproximadamente 47 mil habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Devido à facilidade de disseminação da dengue, pode-se imaginar o grau de dificuldade para o combate efetivo da doença, o que só é possível com a quebra da cadeia de transmissão, eliminando os locais onde o mosquito se reproduz. Desta forma, a prevenção e as medidas de combate exigem a participação e a mobilização de toda a comunidade a partir da adoção de medidas simples, visando à interrupção do ciclo de transmissão e contaminação. Caso contrário, as ações isoladas poderão ser insuficientes para acabar com os focos da doença (TOLEDO, ESCOSTEGUY, MEDRONHO *et al.*, 2006; TRAN e RAFFY, 2006). Outra forma de prevenção contra a dengue seria a utilização de uma vacina eficaz. No entanto, uma vacina tetravalente ainda não está disponível para aplicação em larga escala, ou seja, a qual deverá imunizar contra os quatro sorotipos da dengue (WHO, 2019).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2019), a primeira vacina contra a dengue, Dengvaxia® (CYD-TDV) desenvolvida pela Sanofi Pasteur, foi registrada pela primeira vez em dezembro de 2015 no México e aprovada por autoridades reguladoras em 19 países para uso em áreas endêmicas em pessoas entre 9 e 45 anos de idade. A CYD-TDV trata-se de uma vacina de vírus vivos atenuados, recombinante, quimérica, que utiliza como estrutura básica o vírus vacinal da febre amarela com substituição dos genes responsáveis pela codificação das proteínas de pré-membrana (prM) e do envelope (E) por aqueles de cada um dos quatro sorotipos dos vírus dengue nesta matriz (SABCHAREON, WALLACE, SIRIVICHAYAKUL *et al.*, 2012).

Em abril de 2016, a Organização Mundial da Saúde emitiu uma recomendação condicional sobre o uso da vacina de dengue viva atenuada CYD-TDV em áreas nas quais a dengue é altamente endêmica, conforme definido pela soroprevalência de 70% ou mais. A análise mostrou que o subconjunto de participantes do estudo que foram inferidos como sendo soronegativos no momento da primeira vacinação tinha um risco maior de dengue com sinais de alarme e hospitalizações por dengue em comparação aos participantes não vacinados. No entanto, a vacina demonstrou em ensaios clínicos ser eficaz e segura em pessoas que já tiveram uma infecção prévia por vírus da dengue (indivíduos soropositivos), mas carrega um risco

aumentado de dengue com sinais de alarme naquelas que experimentam sua primeira infecção de dengue após a vacinação (indivíduos soronegativos) (WHO, 2019).

Embora nenhuma vacina licenciada esteja disponível para combater a dengue, uma quantidade substancial de pesquisas está em andamento há muitos anos e em vários países. Como resultado, várias vacinas convencionais estão sendo desenvolvidas e submetidas a testes clínicos (JACOBS e YOUNG, 2003). Duas vacinas tetravalentes atenuadas clássicas para dengue foram desenvolvidas por repetidas passagens em cultura de células. Ensaios clínicos iniciais destas vacinas mostraram que ambas são capazes de induzir uma resposta imune a todos os quatro sorotipos da dengue (STEPHENSON, 2005).

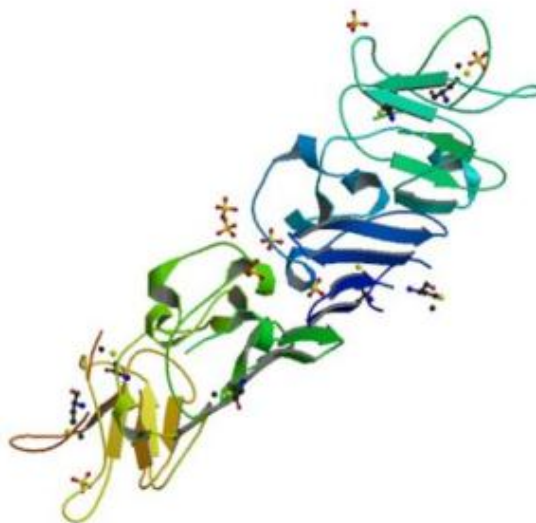
Em vários testes realizados, a maioria das vacinas candidatas contaram com a proteína E para produzir resposta imune. Contudo, é um estimulador relativamente pobre de reações imunes mediadas por células e poderia induzir anticorpos que melhoram a doença. Consequentemente, vários grupos produziram vacinas candidatas que dependem da proteína NS1, e muitos destes produtos demonstraram induzir imunidade específica ao vírus (TIMOFEEV, BUTENKO e STEPHENSON, 2004). A proteína NS3 também pode ser um componente de vacina adicional útil, uma vez que não induz anticorpos neutralizantes, mas é o estimulador mais potente da imunidade mediada por células (STEPHENSON, 2005). Entretanto, os resultados até então obtidos não permitem definir com certeza quando vacinas estarão disponíveis para a doença (GUY, SAVILLE, LANG *et al.*, 2011), restando como alternativa as medidas de combate aos vetores.

### **2.1.3 – Proteína NS1**

Um importante alvo dos anticorpos para o vírus da dengue é a proteína NS1, essencial para a viabilidade do vírus. Esta proteína é expressa na superfície das células infectadas e se encontra na circulação como uma substância solúvel (SILVA, SILVA, ROCCO *et al.*, 2011).

A NS1 é uma glicoproteína não estrutural, que é essencial à replicação do vírus. Contém cerca de 350 a 354 aminoácidos e 12 resíduos de cisteína, além de ser altamente conservada. A NS1 é uma glicoproteína hidrofílica de aproximadamente 48 kDa, sintetizada na forma de monômeros, mas a estrutura molecular da proteína geralmente é dimérica, (SCATURRO, CORTESE, CHATEL-CHAIX *et al.*, 2015), conforme mostra a Figura 2.

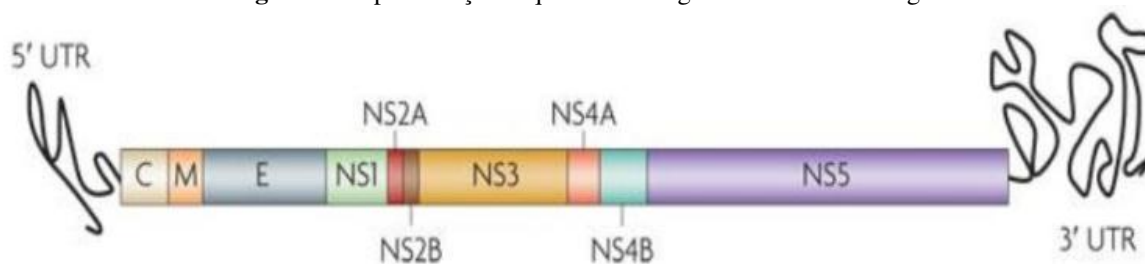
**Figura 2:** Estrutura cristalina de um dímero da proteína não estrutural NS1 do vírus da Dengue.



Fonte: (EDELING, DIAMOND e FREMONT, 2014) Adaptado.

Os *flavivírus* são vírus RNA envelopados, de cadeia simples, cujo genoma apresentado na Figura 3, codifica três proteínas estruturais: C (proteína do núcleo, capsídeo), M (proteína da membrana) e E (proteína do envelope) e sete proteínas não estruturais (NS): NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e a NS5, as quais estão relacionadas com a infecção viral (RIBAS-SILVA e EID, 2012). Dentre as proteínas não estruturais, a NS1 é a mais conservada, apresentando elevado grau de reação cruzada entre os 4 sorotipos da dengue (ZAINAH, WAHAB, MARIAM *et al.*, 2009).

**Figura 3:** Representação esquemática do genoma do vírus Dengue.



Fonte: (GUZMAN, HALSTEAD, ARTSOB *et al.*, 2010).

As proteínas não estruturais são importantes na replicação, na transmissão pelo vetor, na virulência e outras funções no hospedeiro. Elas estão envolvidas na modulação da resposta imune do hospedeiro, por não fazerem parte da estrutura do vírus, e são ativadas somente durante a replicação viral (CHAMBERS, HAHN, GALLER *et al.*, 1990).

A glicoproteína E é responsável pela ligação às células hospedeiras e pelo reconhecimento de anticorpos específicos, isto é, entre as proteínas virais, a proteína E é uma das mais antigênicas, desta forma, os anticorpos para esta proteína inibem a ligação do vírus à célula e neutralizam o vírus. Estes anticorpos apresentam graus variáveis de reação cruzada entre os sorotipos dos DENV (SILVA, SILVA, ROCCO *et al.*, 2011).

A NS1 tem sido aplicada em alguns testes com a finalidade de detectar precocemente o vírus da dengue. A NS1 é uma proteína não estrutural da dengue que é secretada a partir de células infectadas e tem sido usada como um biomarcador para viremia em pacientes, uma vez que esta proteína circula em níveis elevados no sangue durante a fase aguda da doença. Em pacientes com infecções primárias e secundárias, as concentrações de NS1 variam de 10 ng/mL a 2 µg/mL, podendo chegar até cerca de 50 µg/mL, como a concentração atingida no sangue pode ser considerada alta, esta torna-se um alvo relativamente fácil de se detectar (LIBRATY, ENDY, HOUNG *et al.*, 2002).

Alcon e colaboradores (2002) desenvolveram um teste ELISA de captura de antígeno NS1 que revelou que a NS1 secretada está presente no soro de pacientes infectados durante a fase aguda da doença. Isto sugere que ela pode ser usada como um marcador de diagnóstico para dengue, permitindo a detecção precoce do vírus, 24 horas após o início dos sintomas (ALCON, TALARMIN, DEBRUYNE *et al.*, 2002). Ainda foi relatado que este teste é capaz de detectar todos os quatro sorotipos do vírus da dengue. Assim, a confirmação da presença da proteína NS1 no sangue de pacientes pode ser utilizada como ferramenta diagnóstica para a dengue, tornando-se uma alternativa atraente às técnicas atualmente estabelecidas para o diagnóstico da doença (KUMARASAMY, WAHAB, CHUA *et al.*, 2007; YOUNG, HILDITCH, BLETCHLY *et al.*, 2000).

#### **2.1.4 – Diagnósticos laboratoriais**

Um ponto chave para evitar a alta taxa de mortalidade provocada pela dengue e reduzir a carga da doença é diagnosticá-la em seus estágios iniciais. A obtenção de um método eficaz e seguro contra a dengue é uma necessidade para diversos países, incluindo o Brasil, onde a incidência da doença tem aumentado de forma dramática nos últimos anos.

O diagnóstico atual da dengue é baseado na comprovação laboratorial das infecções pelo vírus da dengue, realizado por exames específicos através do isolamento viral em cultura de células, detecção de anticorpos por testes sorológicos, detecção de RNA viral através de reação em cadeia de polimerase de transcrição reversa (RT-PCR) e detecção de antígenos virais



por imunohistoquímica (LUPI e TYRING, 2003). Além destes métodos, kits comerciais para a detecção do antígeno NS1 estão disponíveis atualmente no mercado (SILVA, SILVA, ROCCO *et al.*, 2011).

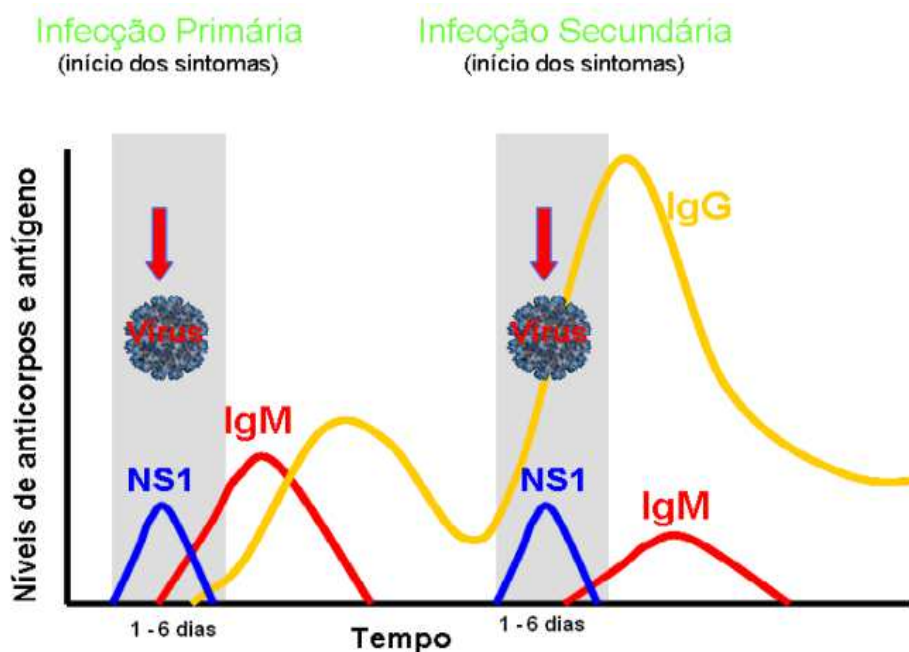
A viremia atinge seu pico logo após o aparecimento dos primeiros sintomas, muitas vezes antes mesmo do paciente apresentar-se doente o suficiente para recorrer a algum tratamento médico. No entanto, vírus circulantes permanecem detectáveis geralmente até o quinto dia da doença, coincidindo com o período em que os níveis de anticorpos começam a elevar-se (VORNDAM e KUNO, 1997).

Segundo Halstead (2007), após o início da doença, o vírus pode ser detectado no soro, no plasma e nas células circulantes por quatro a cinco dias. Durante esta fase, o isolamento viral e a detecção por RNA ou antígenos podem ser usados no diagnóstico da infecção. Após a fase aguda, os testes sorológicos são o método de escolha para o diagnóstico (HALSTEAD, 2007).

A resposta do anticorpo à infecção ocorre de acordo com a imunidade do paciente. O isotipo dominante de imunoglobulina em uma infecção primária é a IgM, conforme mostra a Figura 4. Quando a infecção ocorre em pacientes que não foram infectados antes, o paciente desenvolve uma resposta primária caracterizada por um lento aumento de anticorpos específicos. Uma pequena porcentagem dos pacientes apresenta níveis detectáveis de IgM já no primeiro dia da doença e a maioria (cerca de 93%) encontra-se positivo no sexto dia após o aparecimento dos primeiros sintomas. Os níveis de IgM aumentam rapidamente e atingem seu pico por volta de duas semanas, e então declinam, permanecendo detectáveis por 2 a 3 meses, o que faz destes anticorpos indicadores de infecções recentes (GUBLER, 1998).

Os anticorpos IgG começam a aparecer, em uma infecção primária, alguns dias depois dos IgM, sendo detectáveis a partir do quinto dia de doença. Os títulos de IgG aumentam lentamente a partir da primeira semana de infecção e permanecem detectáveis por toda a vida. Indivíduos com imunidade prévia ao DENV desenvolvem uma infecção secundária caracterizada pelo rápido aumento no título de IgG quase que imediatamente após o início dos sintomas e pelo alto grau de reação cruzada apresentado por esses anticorpos (INNIS, NISALAK, NIMMANNITYA *et al.*, 1989). Os níveis de IgM na resposta secundária são consideravelmente mais baixos do que na resposta primária. A relação entre os títulos de IgM e IgG e a especificidade dos anticorpos pode ser, portanto, usados na caracterização de infecções primárias e secundárias (WHO, 1997).

**Figura 4:** Níveis de anticorpos e antígeno NS1 durante as respostas primária e secundária aos vírus da Dengue.



Fonte: (SILVA, SILVA, ROCCO *et al.*, 2011) Adaptado.

O isolamento do vírus no sangue fornece confirmação definitiva de infecção, sendo o método mais específico que permite a identificação do sorotipo de vírus envolvido. A coleta de sangue é feita no terceiro ou quarto dia do início dos sintomas. Pode ser tentado até o sétimo dia de doença, apesar de ficar mais difícil o isolamento por volta do quinto dia, quando surgem os anticorpos IgM. O resultado é fornecido em uma ou duas semanas (GUBLER, 1998).

Os testes sorológicos identificam na amostra de soro examinada a presença de anticorpos da classe IgM contra o vírus da dengue ou aumento do título de anticorpos IgG em amostras pareadas (conversão sorológica). Em geral, eles só podem ser realizados a partir do sexto dia de doença, quando estes anticorpos começam a surgir, de forma que possuem maior importância epidemiológica do que clínica; e, além disso, não conseguem identificar o sorotipo do vírus envolvido na infecção. O exame mais empregado é o ensaio imunoenzimático de captura de IgM (MAC-ELISA), que detecta anticorpos IgM específicos contra a dengue (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A reação em cadeia de polimerase de transcrição reversa é um método que pode detectar o vírus dentro de um tempo clinicamente significativo (um a dois dias). Pode ser empregado para detectar o RNA viral em amostras clínicas ou em material de necropsia. Tem sensibilidade comparável ao do isolamento viral com a vantagem de o resultado não ser

influenciado pelo manuseio e armazenamento inadequados e nem pela presença de anticorpos (SUDIRO, ISHIKO, GREEN *et al.*, 1997).

A imunohistoquímica pode ser usada para detecção de antígenos virais no fígado, baço, pulmões e linfonodos, sendo que os melhores resultados foram obtidos em fígado. Entretanto, como a biópsia destes órgãos é raramente indicada em pacientes com suspeita de infecção pelo vírus da dengue, este método é geralmente usado somente para diagnóstico pós-morte (KOURI, 2002).

Os kits comerciais para detecção de antígeno NS1 do vírus da dengue tratam-se de um teste qualitativo. Durante a fase aguda da infecção pelo vírus da dengue, a NS1 é encontrada circulando no soro de pacientes em concentrações detectáveis por métodos imunocromatográficos ou imunoenzimáticos. O teste de detecção do antígeno NS1 permite uma detecção mais precoce do vírus, com a finalidade de detectar a infecção antes do aparecimento dos anticorpos da classe IgM e IgG, que é o princípio de diagnóstico da maioria dos testes (SILVA, SILVA, ROCCO, *et al.*, 2011). Seu desempenho é equivalente ao do teste RT-PCR, porém, não permite a identificação do sorotipo. O uso da proteína NS1 tem uma alta especificidade, mas tem moderada sensibilidade e um custo alto (GUZMAN, HALSTEAD, ARTSOB *et al.*, 2010).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2019), novas ferramentas para o diagnóstico de doenças como a dengue devem fornecer medidas acessíveis, sensíveis, específicas, fáceis de usar, rápidas e robustas que podem ser obtidas usando abordagens point-of-care (PAROLO e MERKOÇI, 2013). No entanto, os métodos laboratoriais atualmente disponíveis para o diagnóstico da dengue, como o isolamento viral e detecção de RNA viral por RT-PCR (LANCIOTTI, CALISHER, GUBLER *et al.*, 1992), têm alcance limitado como procedimentos de diagnóstico de rotina, uma vez que são testes muito caros e exigem pessoal altamente qualificado, além disso, envolvem procedimentos complicados e demorados, o que impossibilita a obtenção de um resultado rápido (WHO, 2019).

Os testes sorológicos, como o MAC-ELISA, muito utilizado, são caracterizados por baixa sensibilidade durante os primeiros quatro dias da doença, devido à alta possibilidade de resultados falso negativos no início da doença, com isso, não fornecem um diagnóstico precoce, já que é necessário esperar até o quinto dia ou mais de início da febre para detectar os anticorpos (VAZQUEZ, RUIZ, BARRERO *et al.*, 2010). Além do mais, apresentam baixa especificidade devido à reação cruzada antigênica com outras infecções, o que limita suas aplicações clínicas (KUNO, GOMEZ e GUBLER, 1991). Consequentemente, as metodologias atuais são caras e

demoradas, sofrem de pouca sensibilidade e geram resultados falso positivos (CECCHETTO, CARVALHO, SANTOS *et al.*, 2015).

Diante do contexto atual de diagnósticos disponíveis para a dengue, é necessário o desenvolvimento de um sistema de detecção com alta sensibilidade, especificidade, rápida resposta e baixo custo para uso em aplicações diagnósticas. Desta forma, dispositivos como os biossensores podem ser utilizados para este propósito, pois eles se apresentam como uma alternativa promissora comparados aos métodos existentes, uma vez que apresentam vantagens únicas que permitem uma resposta em tempo real e possibilidade de miniaturização do sistema. Neste sentido, os biossensores se apresentam como uma ferramenta importante para o diagnóstico da dengue.

## **2.2 – Biossensores**

O interesse sem precedentes no desenvolvimento e exploração de dispositivos analíticos para detecção, quantificação e monitoramento de espécies químicas específicas levou ao surgimento dos biossensores. A estimativa de metabólitos como glicose, colesterol e uréia no sangue total é de importância fundamental para diagnósticos clínicos. Assim, os biossensores representam uma nova tendência emergente na tecnologia de diagnósticos (GERARD, CHAUBEY e MALHOTRA, 2002).

Um sensor químico ideal deve possuir velocidade, sensibilidade, seletividade, estabilidade e ser robusto; além disso, não deve ser sensível às mudanças de temperatura e às interferências de vários tipos (MCQUADE, PULLEN e SWAGER, 2000).

Os biossensores são específicos, rápidos, simples de operar e podem ser facilmente fabricados com o pré-tratamento mínimo de amostra. Estes dispositivos oferecem várias vantagens sobre as técnicas analíticas convencionais, incluindo portabilidade, acessibilidade, miniaturização e monitoramento no local, bem como alta sensibilidade e seletividade. Além disso, eles estão sendo desenvolvidos como ferramentas adequadas para diferentes aplicações, incluindo o diagnóstico de doenças, controle de bioprocessos, qualidade de alimentos e outras (FELIX e ANGNES, 2018).

Um biossensor é um dispositivo que possui um componente biológico sensível, intimamente conectado ou integrado em um transdutor, para detecção de analitos (alvo). Nos biossensores, o sistema de reconhecimento se dá através de um mecanismo bioquímico entre o receptor biológico imobilizado na superfície de um transdutor e o analito de interesse. O

objetivo é produzir um sinal eletrônico digital proporcional à concentração de um analito (OLIVEIRA, CONSOLIN-FILHO, PATERNO *et al.*, 2013).

O transdutor é o elemento que percebe as alterações causadas pela interação entre o receptor biológico e seu analito e as converte em um sinal analiticamente mensurável, ou seja, que pode ser eletronicamente visualizado, amplificado e armazenado (CASTILLO, GÁSPÁR, LETH *et al.*, 2004; GRIESE, KAMPOURIS, KADARA *et al.*, 2008), enquanto o receptor é o componente biologicamente ativo, o qual interage de forma específica com o analito. O receptor biológico pode ser enzimas, antígenos/anticorpos, oligonucleotídeos, fragmentos de DNA, peptídeos, lipossomas, organelas, células ou até mesmo microrganismos (SADIK e WALLACE, 1993; VO-DINH e CULLUM, 2000). Esta interação específica pode produzir íons, elétrons, luz ou calor. Desta forma, o receptor é responsável pelo reconhecimento do analito e também pela especificidade e sensibilidade do biossensor (OLIVEIRA, CONSOLIN-FILHO, PATERNO *et al.*, 2013).

A imobilização é uma etapa importante no desenvolvimento de biossensores, devido ao fato do desempenho analítico de um biossensor ser extremamente influenciado pelo processo de imobilização (SASSOLAS, BLUM e LECA-BOUVIER, 2012). A imobilização é o método pelo qual o componente biológico liga-se ao sensor, mantendo suas propriedades biológicas naturais (SETHI, 1994). Dentro de um biossensor, a biomolécula de reconhecimento incorporada possui um excelente nível de seletividade, mas é vulnerável a condições extremas, como temperatura, pH e força iônica (KARYAKIN, VUKI, LUKACHOVA *et al.*, 1999).

A maioria das moléculas biológicas, tais como células, enzimas, antígenos, anticorpos etc., têm vida útil muito curta em fase de solução, assim, elas devem ser fixadas em uma matriz adequada. A imobilização do componente biológico contra as condições ambientais apropriadas resulta em diminuição de sua atividade biológica (SCHUHMANN, LEHN, SCHMIDT *et al.*, 1992). A atividade das moléculas imobilizadas depende da área superficial, porosidade, caráter hidrofílico da matriz imobilizadora, condições reacionais e metodologia escolhida para a imobilização (GERARD, CHAUBEY e MALHOTRA, 2002). Desta forma, várias técnicas de imobilização, tais como adsorção física, aprisionamento, ligação covalente e ligação cruzada têm sido utilizadas para o desenvolvimento de biossensores.

### **2.2.1 – Técnicas de imobilização**

As técnicas de imobilização determinam a estabilidade das biomoléculas nos transdutores influenciando a sensibilidade e confiabilidade do sinal do biossensor. Deste modo,

o principal aspecto a ser observado é a retenção máxima da atividade da biomolécula na superfície do transdutor, sendo uma consequência direta da preservação dos sítios ativos destas biomoléculas, uma vez que as biomoléculas imobilizadas devem manter sua estrutura, função e atividade biológica após a imobilização e não serem desorvidas durante o uso (OLIVEIRA, CONSOLIN-FILHO, PATERNO *et al.*, 2013).

A escolha da técnica de imobilização mais adequada depende da natureza da biomolécula, do transdutor e do método de detecção que será empregado, visto que uma das etapas fundamentais na construção de um biossensor é a deposição do elemento biológico na superfície do transdutor de interesse (OLIVEIRA., CONSOLIN-FILHO, PATERNO *et al.*, 2013).

As técnicas de imobilização baseadas na adsorção física e aprisionamento são classificadas em físicas, enquanto que a ligação covalente e a ligação cruzada são classificadas em químicas (LEI, CHEN e MULCHANDANI, 2006; RAMANATHAN, BANGAR, YUN *et al.*, 2005), sendo a adsorção física e a ligação covalente as técnicas de imobilização mais utilizadas (RAMANATHAN, PANDEY, KUMAR *et al.*, 2000). Estas técnicas são descritas abaixo:

*Adsorção*: esta técnica requer apenas que uma solução contendo o componente biológico seja colocada em contato com o transdutor, onde a interação entre a biomolécula e o transdutor é baseada na formação de forças atrativas de Van der Waals e ligações de hidrogênio. Exemplos: celulose, sílica gel, vidro, polímeros (MIKKELSEN e CORTÓN, 2004; PALACIO e BHUSHAN, 2012; SHARMA, SEHGAL e KUMAR, 2003).

*Aprisionamento*: O polímero é preparado em uma solução contendo biomoléculas. As biomoléculas ficam presas dentro da matriz polimérica, durante a polimerização. Poliacrilamida, amido ou nylon, podem ser empregados para aprisionar biomoléculas (GRIESHABER, MACKENZIE, VOEROES *et al.*, 2008; MALHOTRA, CHAUBEY e SINGH, 2006; YING-SING, SHI-HUI e DE-RONG, 2000).

*Ligação covalente*: realizada por meio da ligação entre grupos funcionais da biomolécula de interesse e uma matriz de suporte. Esta matriz pode ser um filme polimérico (HAUSCHILD, KARKI, COWIE *et al.*, 2005; SCHLICHTIGER, BAIER, YIN *et al.*, 2013).

*Ligação Cruzada*: ocorre por meio de ligações cruzadas intermoleculares entre grupos funcionais das biomoléculas e grupos reativos terminais específicos de agentes bifuncionais, tal como o glutaraldeído, para a imobilização da biomolécula em matrizes sólidas (CHAUBEY, GERARD, SINGHAL *et al.*, 2001; GIL, KUBOTA e YAMAMOTO, 1999).

### 2.2.2 – Classificação dos biossensores

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o elemento biológico, pelo modo de transdução do sinal, ou por uma combinação dos dois (THÉVENOT, TOTH, DURST *et al.*, 2001). No caso do sistema de classificação baseado no elemento biológico, os biossensores podem ser biocatalíticos (LEI, CHEN e MULCHANDANI, 2006; PARK, YOON e KIM, 2010) que utilizam biomoléculas como enzimas, células ou tecidos, ou por bioafinidade (HIRST, YUAN, XU *et al.*, 2008; TELES e FONSECA, 2008) que utilizam antígenos, anticorpos ou fragmentos de DNA imobilizados em superfícies de eletrodos. A classificação dos biossensores eletroquímicos quanto ao tipo de mecanismo de transdução pode ser dividida em amperométricos, potenciométricos, condutimétricos e impedimétricos (RONKAINEN, HALSALL e HEINEMAN, 2010).

O tipo de elemento biológico imobilizado sobre o transdutor diferencia os biossensores quanto à sua aplicação. Desta forma, os biossensores podem ser classificados em enzimáticos, microbiológicos, genossensores e imunossensores.

Os biossensores enzimáticos se baseiam na detecção de substâncias químicas geradas ou consumidas pela reação que ocorre entre uma enzima e seu analito. Geralmente, a enzima interage de forma específica com um dado analito, permitindo assim o desenvolvimento de biossensores com elevada especificidade (WILSON e TURNER, 1992).

Os biossensores microbiológicos consistem na imobilização de fungos, bactérias e organelas vegetais sobre o transdutor. O princípio de operação destes biossensores é baseado no uso das funções metabólicas e respiratórias do microrganismo para detectar um analito, já que os microrganismos podem consumir ou liberar determinados metabólitos eletroquimicamente ativos ( $H_2$ ,  $CO_2$  ou  $NH_3$ ) em contato com o analito de interesse (MELAMED, ELAD e BELKIN, 2012). Uma vez que a quantidade destas substâncias é geralmente proporcional à concentração da espécie alvo, microrganismos podem ser utilizados como o elemento bioativo do biossensor (SU, JIA, HOU *et al.*, 2011).

Os genossensores são biossensores que utilizam DNA ou fragmentos de DNA como biomoléculas, eles podem ser um método promissor para diagnósticos clínicos (CIVIT, FRAGOSO e O'SULLIVAN, 2010; RICCARDI, DAHMOUCHE, SANTILLI *et al.*, 2006) bem como diversas outras aplicações em biotecnologia (TICHONIUK, LIGAJ e FILIPIAK, 2008). Estes sensores podem ser produzidos pela imobilização de oligonucleotídeos capazes de executar o reconhecimento molecular do DNA (PENG, ZHANG, SPIRES *et al.*, 2007; SILVA, VIEIRA, GOULART *et al.*, 2008). Sendo assim, o reconhecimento molecular é realizado pela

hibridização do DNA com as moléculas de oligonucleotídeos presentes na superfície do sensor (ARORA, PRABHAKAR, CHAND *et al.*, 2007; BUDNIKOV, EVTUGYN e PORFIREVA, 2012).

Os imunossensores são baseados na especificidade entre antígenos e anticorpos, que são imobilizados na superfície sensora, com o objetivo de detectar seletivamente a concentração do respectivo alvo (MOHAMMED e DESMULLIEZ, 2011; RICCI, ADORNETTO e PALLESCHI, 2012). Os antígenos ou anticorpos imobilizados em uma matriz acoplada a um transdutor têm a finalidade de detectar alterações em sistemas biológicos, como no diagnóstico de patógenos (AFONSO, ZANETTI, SANTIAGO *et al.*, 2013; TELES, TAVIRA e FONSECA, 2010).

## **2.3 – Imunossensores**

Imunossensores são biossensores baseados em interações específicas entre um antígeno e um anticorpo na superfície de um transdutor (LIN e JU, 2005). Tanto o anticorpo quanto o antígeno podem ser as espécies imobilizadas no transdutor para detectar o antígeno ou o anticorpo, respectivamente. Estes dispositivos apresentam alta sensibilidade e seletividade, tornando-os muito atrativos para muitas aplicações em diferentes campos da química (FELIX e ANGNES, 2018; GUAN, MIAO e ZHANG, 2004).

### **2.3.1 – Princípios básicos dos imunossensores**

A imunologia é a ciência que estuda os mecanismos de defesa dos organismos vivos, em particular de humanos ou outros mamíferos. A resposta imunológica de organismos vivos se dá pelo contato com antígenos, com produção de anticorpos. Os antígenos (substâncias imunogênicas) são capazes de desencadear reação em cadeia, ativando linfócitos (glóbulos brancos) e síntese de anticorpos específicos (sistema imune humoral) (GIL, KUBOTA e YAMAMOTO, 1999).

A interação Ag-Ac é relativamente fraca, envolvendo ligações não covalentes como ligações de hidrogênio, ligações iônicas, ligações hidrofóbicas, assim como interações de Van der Waals (SKELLEY, BROWN e BESCH, 1973). Estas interações ocorrem a curta distância, de forma que, só moléculas contendo regiões específicas ou muito similares (reatividade cruzada) ligam ao sítio de ligação (epítopo) do antígeno do respectivo anticorpo, uma vez que

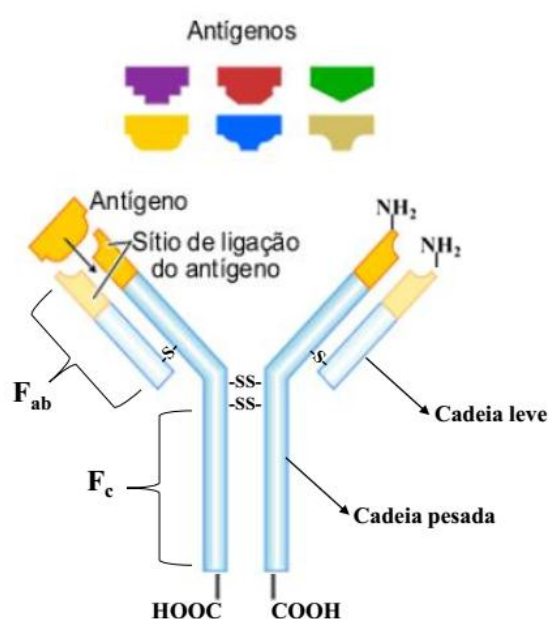


os anticorpos produzidos tem elevada complementaridade com os antígenos correspondentes e vice-versa (JONES, WORTBERG, ROCKE *et al.*, 1997).

Os anticorpos, também conhecidos como imunoglobulinas (Ig), consistem em uma grande família de glicoproteínas capazes de reconhecer antígenos com alta especificidade. Existem geralmente cinco classes distintas de glicoproteínas (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) (DAVIES e METZGER, 1983). Sendo a classe de IgG a mais abundante (aproximadamente 70%) e mais frequentemente utilizada em técnicas imunoanalíticas (WANG, YOU, XU *et al.*, 2008).

Os anticorpos são compostos de uma ou mais cópias de uma unidade característica que pode ser visualizada por sua forma 'Y', conforme mostra a Figura 5.

**Figura 5:** Esquema simplificado para o sistema de seletividade de anticorpos.



Fonte: (ZHANG, JU e WANG, 2011) Adaptado.

Cada anticorpo contém quatro cadeias polipeptídicas – duas cadeias pesadas (longas) idênticas e duas cadeias leves (curtas) idênticas, as quais são ligadas entre si por pontes de dissulfeto, formando uma estrutura simétrica em Y. Uma única ligação dissulfeto conecta cada par de cadeia leve e pesada (GIL, KUBOTA e YAMAMOTO, 1999; WUJCIK, WEI, ZHANG *et al.*, 2014). Em geral, a molécula de anticorpo pode ser dividida em dois fragmentos principais: o fragmento de não ligação ao antígeno, denominado F<sub>c</sub>, e o fragmento de ligação ao antígeno, F<sub>ab</sub> (ZHANG, JU e WANG, 2011). As porções F<sub>ab</sub> ficam próximas ao topo da estrutura em Y e possuem grupos amino que interagem com o sítio de ligação do antígeno. As

sequências dos aminoácidos neste fragmento determinam a especificidade do anticorpo e o tipo de imunoglobulina. Já as extremidades da porção  $F_c$  possuem grupamentos carboxílicos que são utilizados para permitir uma imobilização orientada dos anticorpos à superfície sensora deixando os sítios de ligação ao antígeno livres (RICCARDI, COSTA e YAMANAKA, 2002).

Os antígenos são componentes capazes de iniciar uma resposta imune no organismo, induzindo a produção de imunoglobulinas específicas. Eles são componentes biológicos (toxinas, vírus, bactérias, fungos, protozoários, células e proteínas de tecido) que por sua vez são compostos por proteínas, polissacarídeos e lipídeos. Estas macromoléculas podem apresentar regiões mais expostas que são capazes de estimular a produção de imunoglobulinas (BENJAMIN, BERZOFSKY, EAST *et al.*, 1984).

Um imunossensor é um tipo de biossensor de bioafinidade no qual o anticorpo (Ac) se liga especificamente ao antígeno (Ag) e forma um complexo estável conforme a Equação 1. Essa interação é caracterizada pela constante de afinidade,  $K_A$ , definida pelas concentrações do complexo (Ac-Ag), do antígeno livre e dos sítios livres dos anticorpos no equilíbrio, de acordo com a Equação 2 (RICCARDI, COSTA e YAMANAKA, 2002). A afinidade do Ac e do Ag é uma medida da força de ligação no complexo Ac-Ag resultante. Os valores da constante de afinidade entre  $10^4$  e  $10^{12}$  resultam na alta sensibilidade dos imunoensaios. Para a maioria das interações Ag-Ac sob pH convencional, temperatura e solução tampão, a constante de afinidade tem um valor muito alto; valores até  $10^{15}$  foram relacionados (RICCARDI, COSTA e YAMANAKA, 2002; SURI, RAJE e VARSHNEY, 2002).



Equação 2: 
$$K_A = [Ac-Ag] / [Ac] [Ag]$$

Imunossensores combinam as vantagens de boa sensibilidade e alta seletividade. Além disso, eles permitem que o progresso das imunorreações nas superfícies dos detectores seja seguido em tempo real (FELIX e ANGNES, 2018). Nos imunossensores são detectadas as concentrações de Ag ou Ac. A escolha do transdutor é determinada por sua aplicação analítica. Os principais transdutores empregados são os eletroquímicos (amperométricos (MEDYANTSEVA, VERTLIB, BUDNIKOV *et al.*, 1995; REEVES, SIEBERT, ROBERTS *et al.*, 1995), potenciométricos (BUSH e RECHNITZ, 1987), condutométricos (SANDBERG, VAN HOUTEN, SCHWARTZ *et al.*, 1992) e impedimétricos

(AHMED, RUSHWORTH, WRIGHT *et al.*, 2013; CORDEIRO, GONÇALVES, FRANCO *et al.*, 2019; PIMENTA, SANTOS, THOMASINI *et al.*, 2018; PRODROMIDIS, 2010; WANG, YIXIAN, YE, 2012)), ópticos (BRECHT, PIEHLER, LANG *et al.*, 1995) e os piezoelétricos (SULEIMAN e GUILBAULT, 1994). No entanto, os imunossensores amperométricos, nos quais enzimas são empregadas como marcadores, e os impedimétricos, nos quais são realizadas medidas diretas das propriedades elétricas da superfície monitorada, têm sido os mais relatados na literatura.

### 2.3.2 – Imunossensores impedimétricos

O desenvolvimento de métodos direcionados ao monitoramento direto das interações Ag-Ac é particularmente atraente, uma vez que o objetivo de muitas pesquisas atuais é estabelecer métodos alternativos aos imunoensaios baseados em ELISA já existentes. Entre os diferentes tipos de imunossensores que possibilitam a monitoração direta de tais interações, os imunossensores impedimétricos têm recebido atenção especial nos últimos anos, pois possuem características atrativas associadas ao uso de transdutores eletroquímicos, isto é, baixo custo, instrumentação econômica e capacidade de ser miniaturizado e de ser integrado em ferramentas de diagnóstico controladas por microprocessadores (PRODROMIDIS, 2010).

O desenvolvimento de dispositivos sensores tem como ideia inicial a avaliação de processos interfaciais e superficiais, uma vez que estes processos são de fundamental importância no entendimento dos mecanismos de interação entre o sistema de reconhecimento e o analito (SWALEN, ALLARA, ANDRADE *et al.*, 1987). Além de tudo, o estudo de processos interfaciais e superficiais é muito importante para a escolha do método de imobilização de espécies sobre a superfície de eletrodos. Assim, o estudo destes processos pode auxiliar na escolha do melhor meio de imobilização a ser usado e indicar as principais características como vantagens e desvantagens associadas a cada método de imobilização (FREIRE, PESSOA, MELLO *et al.*, 2003; SANTOS, GORTON e KUBOTA, 2002). Desta forma, ressalta-se a relevante importância que tem adquirido as técnicas capazes de avaliar fenômenos em superfícies e interfaces, incluindo métodos espectroscópicos, microscópicos ou acústicos, como a microscopia de força atômica (STOICA, TEODORESCU, BLANCHIN *et al.*, 2003), microbalança de cristal de quartzo (PAVEY, HUNTER e PAUL, 2003), ressonância de plásmons de superfície (KIM, CHOI, SUH *et al.*, 2002), espectroscopia Raman (GEURTS, 1993), espectroscopia de impedância eletroquímica (SCHWEISS, WERNER e KNOLL, 2003) e outros.

Desde os trabalhos pioneiros de Newman e Martelet (1988), sobre o conceito de imunossensores impedimétricos, muito trabalho tem sido feito nessa área específica (BATAILLARD, GARDIES, JAFFREZIC-RENAULT *et al.*, 1988). Durante as duas últimas décadas, a espectroscopia de impedância eletroquímica tem sido amplamente utilizada para detecção de vários tipos de interações biomoleculares, como Ag-Ac, hibridização de DNA, triagem biomolecular rápida e monitoramento de cultura em células (DANIELS e POURMAND, 2007; GUAN, MIAO e ZHANG, 2004; KATZ e WILLNER, 2003). Assim, a espectroscopia de impedância eletroquímica tem adquirido grande importância, uma vez que possibilita a obtenção de grande número de informações a partir de um único experimento (JIANG e KUCERNAK, 2002).

### 2.3.2.1 – Espectroscopia de impedância eletroquímica

A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) envolve a aplicação de uma perturbação de potencial ou de corrente no sistema sob investigação. A perturbação do sistema é feita mediante a aplicação de um potencial contínuo (potencial central aplicado) sobre a qual é imposta uma variação senoidal de potencial com pequena amplitude. Este método de aplicação do potencial possibilita que o sistema seja perturbado empregando poucos milivolts (5-10 mV), de forma a tornar possível a investigação de fenômenos eletroquímicos próximos ao estado de equilíbrio, onde  $E = E_{ocp}$ . Além disso, é possível perturbar o sistema usando diferentes valores de frequência, pois a onda de potencial é senoidal. Uma vez que a perturbação no sistema sob investigação é de pequena amplitude é possível empregar a técnica para a análise de etapas de mecanismos reacionais (BARD e FAULKNER, 2002).

A EIE fornece informações importantes sobre as características de um sistema eletroquímico, como a resistência da solução ( $R_s$ ), a resistência à transferência de carga ( $R_{ct}$ ), a capacitância de dupla camada ( $C_{dl}$ ) e a impedância de difusão ( $W$ ). É também um método eficiente para avaliar a taxa de transferência de elétrons no eletrodo na presença de espécies redox em solução (OLIVEIRA, VIEIRA, ALVES *et al.*, 2010b).

As medidas de EIE são realizadas variando-se os valores de altas frequências para baixas frequências. Desta forma, diferentes processos físicos e químicos podem ser separados por suas constantes de tempo. Após o experimento, os resultados de impedância são apresentados através do diagrama de Nyquist, que representa graficamente  $Z''$  (componente imaginário da impedância) vs  $Z'$  (componente real da impedância) (MACDONALD e BARSOUKOV, 2005).

Valores da parte imaginária da impedância ( $Z''$ ) estão em função dos valores da parte real ( $Z'$ ). Um diagrama de Nyquist ideal apresenta um semicírculo na região de altas frequências e uma variação linear em médias e baixas frequências. Na região de altas frequências, o efeito da relaxação de transferência de carga é mostrado através de semicírculo, do qual pode-se obter valores de  $R_s$ ,  $R_{ct}$  e  $C_{dl}$ . Aos dados obtidos por EIE é atribuído um modelo de circuito equivalente que simula a resposta do sistema eletroquímico. Os componentes do circuito são resistores que simulam o comportamento resistivo do eletrodo, o eletrólito e materiais depositados na superfície do eletrodo, por exemplo polímeros; capacitores que simulam o comportamento capacitivo do eletrodo/polímero e interface polímero/eletrólito, e outros (JOHNSON, READ, CHRISTENSEN *et al.*, 1994).

A EIE é uma ferramenta poderosa para a medida de processos não faradáicos, nos quais predomina o comportamento capacitivo estabelecido pela separação de cargas na interface eletrodo/eletrólito, enquanto que os processos faradáicos envolvem a transferência de carga entre o eletrodo e algumas espécies a serem oxidadas ou reduzidas presentes na solução (PRODROMIDIS, 2010).

Em um imunossensor impedimétrico faradáico, a resposta mensurada se deve à superfície do eletrodo. Neste caso, o parâmetro medido é a resistência à transferência de carga, e espera-se que as interações Ac-Ag causem um aumento em seu valor à medida que a reação faradáica se torna cada vez mais impedida com o tempo (PRODROMIDIS, 2010). A EIE pode monitorar com sensibilidade as mudanças na resistência à transferência de carga associadas à ligação de alvos em superfícies de eletrodos especificamente preparados e não requer marcadores (LISDAT e SCHÄFER, 2008).

Johnson e colaboradores (2012) relataram que o uso de EIE em medidas de impedância faradáica de eventos clássicos de ligação Ac-Ag mostra boa reprodutibilidade e sensibilidade (JOHNSON, SONG, KO FERRIGNO *et al.*, 2012), apresentando assim baixos limites de detecção. Portanto, estes dispositivos potencialmente podem ser usados para diversas aplicações, como o diagnóstico de doenças, tal como a dengue.

### **2.3.3 – Imunossensores para o diagnóstico de Dengue**

Diversos imunossensores para dengue utilizando diferentes métodos de detecção têm sido desenvolvidos e estão descritos na literatura. Alguns destes são imunossensores impedimétricos, baseados nas mudanças das propriedades elétricas resultantes da interação antígeno-anticorpo sobre a superfície dos eletrodos.

Nawaz e colaboradores (2018) fabricaram um imunossensor para a detecção da proteína não estrutural (NS1) baseado em anticorpo não estrutural acoplado a eletrodos impressos de carbono modificados com albumina de soro bovino (BSA) como substrato de transdução para o diagnóstico precoce do vírus da dengue. O imunossensor impedimétrico apresentou uma faixa linear de 1-200 ng/mL, com limite de detecção de 0,3 ng/mL (NAWAZ, HAYAT, CATANANTE *et al.*, 2018).

Cecchetto e colaboradores (2015) desenvolveram um imunossensor impedimétrico para a detecção da proteína NS1, baseado em um eletrodo de ouro modificado com monocamadas auto-organizadas para o diagnóstico da dengue. O eletrodo modificado apresentou uma resposta linear para a proteína alvo em concentrações que variaram de 0,01 a 2,00 µg/mL e 0,01 a 1,00 µg/mL para tampão fosfato e soro sanguíneo puro, respectivamente. O biossensor apresentou limite de detecção de 0,3 ng/mL e 30 ng/mL para NS1 diluída tampão fosfato e em soro sanguíneo puro, respectivamente (CECCHETTO, CARVALHO, SANTOS *et al.*, 2015).

Dias e colaboradores (2015) desenvolveram um imunossensor descartável baseado em eletrodos impressos de nanotubos de carbono para a proteína NS1 do vírus da dengue. Os anticorpos anti-NS1 foram ligados covalentemente à superfície de eletrodos impressos de nanotubos de carbono por filme de etilenodiamina. Foi obtido um limite de detecção de 12 ng/mL e uma resposta linear de 40 a 2000 ng/mL para a NS1 (DIAS, GOMES-FILHO, SILVA *et al.*, 2013).

Camara e colaboradores (2013) descreveram um sensor de fibra óptica baseado na ressonância de plásmon de superfície utilizando nanopartículas de ouro imobilizadas na extremidade da fibra. O sensor foi capaz de detectar antígenos NS1 em diferentes concentrações, com um limite de quantificação de 74 ng/mL (CAMARA, GOUVÊA, DIAS *et al.*, 2013).

Cavalcanti e colaboradores (2012) descreveram um imunossensor eletroquímico baseado em eletrodo de filme de ouro obtido de CDs (*compact disk*) graváveis para detecção de NS1. O imunossensor mostrou uma resposta linear de 1 a 100 ng/mL de NS1 com limite de detecção de 0,33 ng/mL (CAVALCANTI, GUEDES, SOTOMAYOR *et al.*, 2012).

Silva e colaboradores (2014) desenvolveram um imunossensor eletroquímico baseado em eletrodos impressos de carbono modificados com tiofeno para diagnóstico precoce de dengue. O sensor apresentou uma faixa linear nas concentrações de 0,05 a 0,6 µg/mL de NS1 (  $R = 0,991$ ), com limite de detecção de 15 ng/mL (SILVA, DIAS, CORDEIRO *et al.*, 2014).

Nestes casos citados, o nível da proteína NS1 detectado está dentro da faixa encontrada nos soros dos pacientes com dengue (LIBRATY, ENDY, HOUNG *et al.*, 2002). Contudo, ainda se faz necessário o uso de novas tecnologias no desenvolvimento de dispositivos sensores portáteis, de baixo custo e resposta rápida para uso no diagnóstico precoce da dengue. Neste contexto, pesquisas recentes demonstram que biossensores baseados em polímeros condutores têm sido muito utilizados na área de diagnóstico clínico, tornando-se produtos comerciais portáteis e cada vez mais miniaturizados.

## **2.4 – Aplicação de polímeros condutores em biossensores**

Desde o aparecimento dos polímeros condutores como uma nova classe de materiais, diferentes aplicações têm surgido nas mais diversas áreas do conhecimento (BERNIUS, INBASEKARAN, O'BRIEN *et al.*, 2000; COAKLEY e MCGEHEE, 2004). Contudo, nos últimos 40 anos, os polímeros condutores atraíram muito interesse no desenvolvimento de biossensores, uma vez que são conhecidos por possuírem inúmeras características, que lhes permitem atuar como excelentes materiais para a imobilização de biomoléculas e rápida transferência de elétrons para a fabricação de biossensores eficientes (AHUJA, MIR e KUMAR, 2007; BOROLE, KAPADI, MAHULIKAR *et al.*, 2006; VIDAL, GARCIA-RUIZ e CASTILLO, 2003).

Os biossensores baseados em polímeros condutores são constituídos geralmente de um transdutor e de um material polimérico que interage com o analito provocando uma mudança nas propriedades elétricas e óticas que, são convertidas em um sinal mensurável que fornecerá informações qualitativas e/ou quantitativas sobre o analito em estudo (SCHWARTZ, 2003).

A aplicação de polímeros condutores em biossensores pode aumentar a velocidade, sensibilidade e versatilidade destes dispositivos, além de ser uma ferramenta de baixo custo, capaz de identificar e/ou quantificar uma grande quantidade de analitos químicos e biológicos imprescindíveis para o controle de qualidade de alimentos, bebidas, fármacos e diagnósticos clínicos (MCQUADE, PULLEN e SWAGER, 2000). Além disso, estes dispositivos podem diminuir custos e o tempo de análise em relação à maioria dos métodos analíticos convencionais (BERNIUS, INBASEKARAN, O'BRIEN *et al.*, 2000; MEDEIROS, OLIVEIRA, CONSOLIN-FILHO *et al.*, 2012).

O emprego de polímeros condutores no desenvolvimento de biossensores constitui em uma excelente alternativa para melhorar o desempenho de um biossensor (CALVO-PÉREZ,

DOMÍNGUEZ-RENEO, ALONSO-LOMILLO *et al.*, 2013; QI, WAN e ZHANG, 2013), uma vez que o uso de polímeros condutores é adequado para a imobilização de biomoléculas, pois o aumento da área de contato das biomoléculas com o eletrodo permite maior acomodação da molécula, simulando seu ambiente natural, favorecendo a conversão do sinal biológico para um rápido sinal analítico com alta estabilidade e reprodutibilidade (CHRISTINE, VENKATRAM, JOSEPH *et al.*, 1997; SADKI, SCHOTTLAND, BRODIE *et al.*, 2000; TLILI, KORRI-YOUSSOUFI, PONSONNET *et al.*, 2005).

As principais vantagens de se usar polímeros condutores como matrizes para imobilização de moléculas biológicas e sintéticas dizem respeito principalmente à diversidade de tipos de polímeros condutores que podem ser usados e seu custo relativamente baixo, assim como as técnicas usadas para obtenção do sinal elétrico são comparativamente mais baratas. Os polímeros condutores associados às moléculas de reconhecimento podem ser usados para produzir sensores altamente específicos e sensíveis, que realizam análises relativamente rápidas de diversificados analitos, incluindo os biológicos (COAKLEY e MCGEHEE, 2004; MCQUADE, PULLEN e SWAGER, 2000).

Os polímeros condutores são altamente promissores para a construção de sensores eletroquímicos robustos e confiáveis, de baixo custo e com a possibilidade de fácil miniaturização (PRISSANAROON-OUAJAI, PIGRAM, JONES *et al.*, 2008). Devido às diversas características apresentadas pelos filmes poliméricos, vários estudos são encontrados na literatura visando sua aplicação na construção de biossensores (LEE e SHIM, 2001; PIRO, HACCOUN, PHAM *et al.*, 2005; SANTHANAM, 1998).

## **2.5 – Polímeros condutores**

Os polímeros são amplamente conhecidos por serem leves, flexíveis, isolantes e pelas suas características físicas e estruturais. Grande parte dos polímeros não apresentam eficiência ao conduzir eletricidade, pois não possuem uma quantidade de elétrons livres suficiente para compartilhar no processo de condução. Deste modo, por volta da década de 50, iniciaram-se tentativas de associar propriedades elétricas dos metais às propriedades mecânicas dos polímeros, por meio da incorporação de cargas condutoras, como fibras metálicas ou fibras de carbono, com a intenção de produzir “polímeros condutores extrínsecos”, assim chamados porque a carga condutora seria adicionada (FAEZ, REZENDE, MARTIN *et al.*, 2000).

Desde a década de 60, é conhecido que moléculas orgânicas que apresentam ligações duplas conjugadas podem exibir propriedades semicondutoras. Contudo, a descoberta



dos polímeros condutores teve início no começo dos anos 70 quando Shirakawa e Ikeda demonstraram a possibilidade de preparar filmes auto suportados de poliacetileno pela polimerização direta do acetileno (SHIRAKAWA e IKEDA, 1974).

Embora o poliacetileno tenha sido o primeiro polímero condutor sintetizado (NATTA, MAZZANTI e CORRADINI, 1958), devido à sua instabilidade térmica e ambiental, outros polímeros passaram a ser investigados intensivamente com o intuito de superar estas limitações. Assim, os polímeros heterocíclicos, dentre eles o polipirrol, politiofeno e polianilina, e seus derivados, são os mais estudados. Apesar destes materiais serem conhecidos há muito tempo, uma “redescoberta” se deu no final da década de 70, após o trabalho pioneiro dos grupos de Shirakawa, MacDiarmid e Heeger, relatando a condutividade metálica do poliacetileno dopado com iodo. Estes pesquisadores produziram o primeiro “metal orgânico”, ao evidenciarem que era possível aumentar a condutividade do poliacetileno se ocorresse a sua oxidação com vapor de iodo, cloro ou bromo (SHIRAKAWA, LOUIS, MACDIARMID *et al.*, 1977). A partir disso, houve um crescimento significativo das pesquisas sobre estruturas poliméricas conjugadas (MAIA, DE PAOLI, ALVES *et al.*, 2000).

Nos últimos anos uma nova classe de polímeros orgânicos, conhecidos até então como materiais isolantes, tem sido desenvolvida, cuja importância está relacionada à possibilidade de conduzir eletricidade sem a necessidade de incorporação de cargas condutoras (FAEZ, REZENDE, MARTIN *et al.*, 2000). As conhecidas propriedades isolantes elétricas dos polímeros podem ser alteradas para permitir que atuem também como materiais condutores (GERARD, CHAUBEY e MALHOTRA, 2002). Esta nova classe de materiais é conhecida como “polímeros intrinsecamente condutores” (MACDIARMID, 2001), os quais possuem uma característica em comum: longos sistemas  $\pi$  conjugados. Esta conjugação permite que seja criado um fluxo de elétrons, que são facilmente removidos ou adicionados na cadeia polimérica para formar um íon polimérico (FAEZ, REZENDE, MARTIN *et al.*, 2000). O maior interesse é combinar, simultaneamente, em um mesmo material as propriedades elétricas de um semicondutor ou metal com as vantagens de um polímero, como leveza, resistência e flexibilidade (MAIA, DE PAOLI, ALVES *et al.*, 2000).

Os polímeros intrinsecamente condutores são materiais descobertos há mais de 40 anos (SHIRAKAWA, LOUIS, MACDIARMID *et al.*, 1977). Dentre estes, destacam-se os que apresentam ligações  $\pi$  alternadas e anéis aromáticos, sendo a polianilina um dos polímeros intrinsecamente condutores mais promissores, uma vez que apresenta valores elevados de condutividade, propriedades de troca iônica, propriedades eletrocromicas, grande estabilidade quando exposta ao ambiente, um processo de síntese e dopagem simples, além de ser obtida a

partir de um monômero de baixo custo (AMADO, SILVEIRA, RODRIGUES JR *et al.*, 2008). Estes polímeros são também denominados de “metais sintéticos” por possuírem propriedades elétricas, magnéticas e ópticas semelhantes às propriedades dos metais (MACDIARMID, 2001). Os polímeros podem passar de isolantes a condutores pela adição de agentes de transferência de carga, denominados de “dopantes” (RONCALI, 1992).

### 2.5.1 – Dopagem de polímeros condutores

Os materiais, de uma forma geral, podem ser classificados em isolantes, semicondutores (polímeros condutores) e condutores (metais), de acordo com a capacidade de condução de corrente elétrica. A descoberta no final da década de 70, de que o poliacetileno poderia aumentar drasticamente a sua condutividade, aperfeiçoou os estudos da condutividade elétrica em materiais poliméricos (SHIRAKAWA, LOUIS, MACDIARMID *et al.*, 1977).

Os polímeros condutores pertencem à classe dos polímeros conjugados. As cadeias são denominadas conjugadas porque apresentam uma sequência de ligações simples e duplas alternadas, resultando em elétrons desemparelhados e deslocalizados ao longo da cadeia polimérica. Desta forma, a condutividade elétrica dos polímeros condutores está associada à presença do sistema  $\pi$  conjugado em sua estrutura, podendo passar de isolantes a condutores através de um processo de oxidação ou redução, que envolve a remoção ou adição de elétrons na cadeia polimérica (GIROTTTO e DE PAOLI, 1999). Essas reações redox proporcionam aumento da mobilidade dos elétrons e também da condutividade (JÚNIOR, NETO e KUBOTA, 1997).

Um critério importante na seleção dos polímeros é a facilidade com que os mesmos podem ser oxidados ou reduzidos, levando à escolha de compostos com insaturações conjugadas que possuam baixo potencial de oxidação (MATTOSO, 1996).

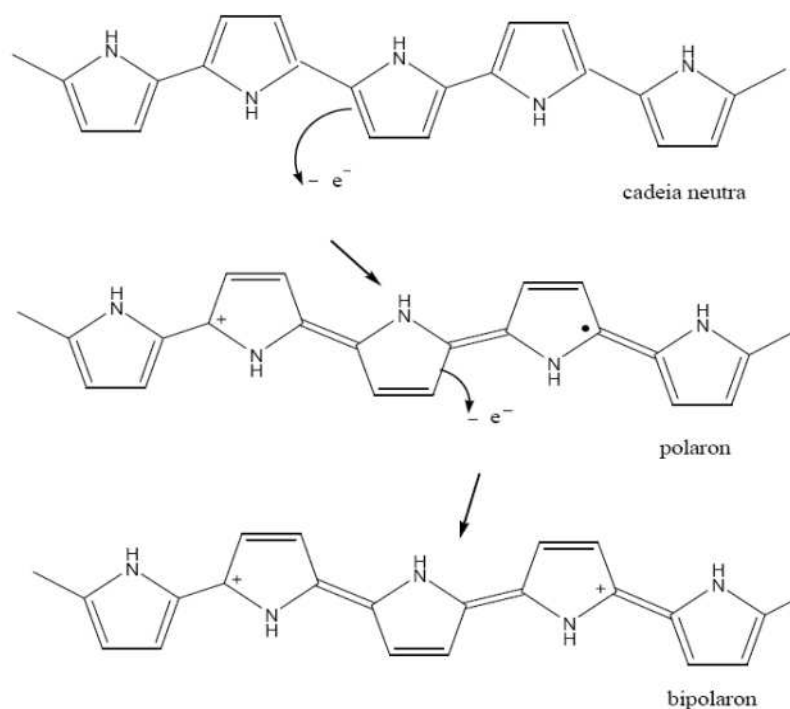
O mecanismo de exposição do polímero a agentes oxidantes ou redutores é conhecido como “dopagem” (SHIRAKAWA e IKEDA, 1974). O processo de dopagem é reversível, assim a cadeia polimérica não é alterada de maneira permanente (PATIL, HEEGER e WUDL, 1988). Os polímeros apresentam quase nenhuma condutividade no estado neutro, por isso a dopagem é uma etapa imprescindível para que polímeros adquiram cargas transportadoras e se convertam de isolantes a semicondutores ou condutores (MAIA, DE PAOLI, ALVES *et al.*, 2000).

Os principais tipos de dopagem utilizados são denominados: tipo-*p* e tipo-*n*. O uso de agentes oxidantes dá origem a uma dopagem tipo-*p* e os agentes redutores ao tipo-*n*. A

condutividade intrínseca é produzida a partir da formação de cargas transportadoras mediante estes agentes oxidantes ou redutores através da estrutura conjugada ao longo da cadeia polimérica. A oxidação do polímero neutro provoca a formação de pólarons (BREDAS e STREET, 1985), e se um elétron adicional é removido, a espécie energeticamente mais favorável de se formar é um bipólaron. No entanto, é importante notar que antes da formação do bipólaron, a cadeia inteira dos polímeros condutores deve tornar-se primeiramente saturada com pólarons (KANATZIDIS, 1990). Os pólarons e bipólarons estão livres para se movimentarem ao longo da cadeia polimérica, resultando na condutividade eletrônica (BREDAS e STREET, 1985).

Pólarons e bipólarons são termos usados na física da matéria condensada equivalentes a cátion radical e dicátion, respectivamente, na terminologia química. Desta forma, um pólon é definido como um cátion radical que carrega um elétron desemparelhado e uma carga positiva, enquanto o bipólaron é definido como um par de cargas iguais, ou seja, um dicátion (KILMARTIN e WRIGHT, 2001). A Figura 6 mostra a formação de pólarons e bipólarons na oxidação do polipirrol.

**Figura 6:** Oxidações do polipirrol e a formação de pólarons e bipólarons.



Fonte: (MAIA, DE PAOLI, ALVES *et al.*, 2000).

A reação de dopagem envolve um processo de transporte de carga no qual sítios do monômero no estado oxidado e contra íons compensadores de carga se difundem através do filme polimérico. A reação de oxidação pode ser efetuada tanto por aplicação de potencial apropriado como também usando um agente químico oxidante, porém, neste caso é o agente oxidante que se difunde pelo polímero (MURRAY, R., 1992). A condutividade elétrica dos filmes poliméricos origina-se a partir da estrutura eletrônica (deslocalização de elétrons  $\pi$ ) de sua cadeia polimérica. Em geral, a razão de transporte de carga em um polímero eletroativo pode depender de alguns fatores como difusão e/ou migração de contra íons no filme para manter a eletroneutralidade, tipo de solvente, morfologia da cadeia polimérica, concentração do monômero, potencial, carga ou corrente aplicados e duração (JÚNIOR, NETO e KUBOTA, 1997).

Ao se adicionar o agente dopante, este gera uma deslocalização de cargas na cadeia polimérica com a neutralização através dos contra íons (dopantes), os quais são responsáveis pelo aumento na condutividade (GENIES e LAPKOWSKI, 1987; TROJANOWICZ, KRAWCZYNSKI VEL KRAWCZYK e ALEXANDER, 1997). No estado dopado, a cadeia polimérica consiste de um sistema  $\pi$  deslocalizado, enquanto no estado não dopado o polímero pode ter uma estrutura conjugada (MEDEIROS, OLIVEIRA, CONSOLIN-FILHO *et al.*, 2012). Na maioria dos polímeros condutores, como polipirrol e politiofeno, o processo de dopagem ocorre simultaneamente com a oxidação da cadeia. Elétrons são retirados da cadeia durante a oxidação e há inserção de contra íons para balancear a carga. Assim, os processos de dopagem e desdopagem envolvem contra íons, que estabilizam o estado dopado, estes processos podem ser realizados por meio de métodos químicos ou eletroquímicos.

### **2.5.2 – Obtenção de polímeros condutores por eletropolimerização**

Os polímeros condutores podem ser obtidos por síntese química ou eletroquímica, isto é, através da oxidação química ou eletroquímica dos respectivos monômeros. Na síntese química, um agente oxidante apropriado é adicionado ao sistema reacional, promovendo o processo de polimerização radicalar, aniônica ou catiônica. A princípio, o requisito básico para a espécie ser utilizada como oxidante é possuir um potencial de redução suficiente para a oxidação do monômero provocando a formação do cátion radical (MAIA, DE PAOLI, ALVES *et al.*, 2000). Posteriormente, o produto da reação de oxidação deve ser separado, lavado, purificado e seco. A vantagem deste método é a obtenção facilmente de grandes quantidades de polímero (AMADO, SILVEIRA, RODRIGUES JR *et al.*, 2008).

A síntese eletroquímica se tornou o método geral preferido para a preparação de polímeros condutores devido à sua simplicidade e reprodutibilidade. A vantagem da polimerização eletroquímica é que as reações podem ser realizadas à temperatura ambiente. Variando o potencial ou a corrente com o tempo, a espessura do filme pode ser controlada (GERARD, CHAUBEY e MALHOTRA, 2002). Neste tipo de síntese, a polimerização ocorre em uma célula eletroquímica, sobre a superfície de um eletrodo (ânodo) imerso em um meio adequado contendo o monômero dissolvido, por meio da aplicação de uma diferença de potencial ou corrente, com intensidade suficiente para promover a oxidação do monômero, iniciando o processo de eletropolimerização (FAEZ, REZENDE, MARTIN *et al.*, 2000).

O mecanismo de eletropolimerização propõe a eletroxidação do monômero, gerando um cátion radical que leva à formação de dímeros e aos produtos poliméricos. Quando o propósito é obter eletrodos modificados com polímeros condutores, o método eletroquímico oferece a vantagem de o polímero condutor já ser obtido como filme aderido à superfície do eletrodo (MUÑOZ, COLINA, HERAS *et al.*, 2006). Além disso, não é necessário que o polímero passe pela etapa de purificação, normalmente dispendiosa e de difícil execução como no método químico, e a espessura dos filmes obtidos sobre os eletrodos pode ser facilmente controlada em função do tempo de síntese utilizado. Contudo, a desvantagem deste método é a de produzir uma quantidade pequena de polímero em relação ao método químico (AMADO, SILVEIRA, RODRIGUES JR *et al.*, 2008).

As técnicas eletroquímicas são ferramentas poderosas e versáteis, que oferecem precisão, exatidão e sensibilidade com custo relativamente baixo e instrumentação simples. Além disso, as vantagens destas técnicas são a exigência de pequenos volumes de amostra e portabilidade. Assim, elas são as técnicas mais utilizadas para a síntese de polímeros condutores (D'ERAMO, ZÓN, FERNÁNDEZ *et al.*, 2008; HOSSEINI, BAGHERI e NAJJAR, 2011; TAOUIL, LALLEMAND, HAHN *et al.*, 2011), visando à construção de sensores químicos, pela facilidade no controle das variáveis que influenciam na formação dos filmes, levando à diferentes morfologias e propriedades condutoras (JÚNIOR, NETO e KUBOTA, 1997).

As técnicas eletroquímicas utilizadas para a realização das polimerizações são a cronopotenciometria (TANG, ZHOU, ZHONG *et al.*, 2006), cronoamperometria (BLANKESPOOR e MILLER, 1985) e, a técnica mais comum, a voltametria cíclica (SANKARAN e REYNOLDS, 1997; SOTZING, REYNOLDS e STEEL, 1996). A eletropolimerização realizada por voltametria cíclica consiste em escolher uma faixa de

potencial de varredura, que contém o potencial de oxidação do monômero, e o potencial varia com uma determinada velocidade de varredura (ALVES, CALADO, MATENCIO *et al.*, 2010), produzindo filmes poliméricos eletroativos e condutores (MUÑOZ, COLINA, HERAS *et al.*, 2006).

Os polímeros têm sido extensivamente estudados nos últimos anos, por serem amplamente utilizados como materiais condutores. Suas propriedades semicondutoras e eletroquímicas resultam em uma série de aplicações em novos dispositivos (LI, BAI e SHI, 2009; MAIA, DE PAOLI, ALVES *et al.*, 2000).

### 2.5.3 – Aplicação dos polímeros condutores

Os polímeros condutores, desde que foram descobertos em 1977, têm tido inúmeras aplicações, especialmente em química analítica, voltadas à construção de novos sensores (ZENG, LIU, DIAMOND *et al.*, 2010). Entre alguns exemplos de aplicação destes polímeros condutores (DESHPANDE e AMALNERKAR, 1993; MACDIARMID, A., YANG, HUANG *et al.*, 1987; OKABAYASHI, GOTO, ABE *et al.*, 1987), estão a eletrocatalise (BULL, FAN e BARD, 1983), fabricação de baterias recarregáveis (ANGELO, 2006; OH, KIM, LEE *et al.*, 2011), fotoeletroquímica (KAMAT e FOX, 1984), dispositivos eletrocromáticos onde a reação direta de oxidação é responsável pela mudança na coloração das espécies em solução (SILVA, NOGUEIRA, TONHOLO *et al.*, 2011), diodos emissores de luz (ALSALHI, ALAM, DASS *et al.*, 2011), proteção contra corrosão (KARPAKAM, KAMARAJ, SATHIYANARAYANAN *et al.*, 2011), além da construção de biossensores (AHUJA, MIR e KUMAR, 2007; COSNIER e HOLZINGER, 2011) e sensores químicos voltados à monitoração analítica (BLANCO-LOPEZ, LOBO-CASTANON, MIRANDA-ORDIERES *et al.*, 2003; GARCÍA, BLANCO e IVASKA, 1998; GARDNER e BARTLETT, 1993).

As propriedades elétricas e físico-químicas dos polímeros condutores estão associadas à sua estrutura. Muitas investigações têm sido relatadas utilizando novos monômeros e consecutivamente, obtendo novos polímeros que possam ser aplicados em áreas, como a eletroquímica (CHEN e FA, 2003; ISMAIL, KHALIFA, AZZEM *et al.*, 2002; WALLACE, TEASDALE, SPINKS *et al.*, 2002). Além disso, os polímeros condutores também são muito utilizados para funcionalizar a superfície sensora de dispositivos eletrônicos como nos eletrodos quimicamente modificados (MILLER, 1993).

#### 2.5.4 – Eletrodos quimicamente modificados com polímeros

Eletrodos com superfície de grafite, de ouro ou de outros materiais condutores, podem ser recobertos com algum tipo de polímero condutor ou até mesmo não condutor com uma finalidade específica de alterar a condutividade elétrica de sua superfície para um objetivo específico (PEREIRA, SANTOS e KUBOTA, 2002).

Os métodos eletroanalíticos têm despertado grande interesse nos últimos anos, por possibilitar o uso de eletrodos quimicamente modificados, uma vez que o ato de imobilizar uma determinada substância na superfície de um eletrodo representa um artifício simples e eficaz para o desenvolvimento de procedimentos e métodos eletroanalíticos mais eficientes, permitindo obter maior sensibilidade, seletividade, reprodutibilidade, e maior estabilidade ao sistema em estudo quando comparado aos eletrodos não modificados (STRADIOTTO, YAMANAKA e ZANONI, 2003).

A utilização de eletrodos quimicamente modificados é uma área em crescente expansão, principalmente no aspecto do desenvolvimento de novos materiais e de métodos de modificação de superfície de eletrodos, o que visa ampliar e potencializar as aplicações destes dispositivos (VAN DORST, MEHTA, BEKAERT *et al.*, 2010).

Os primeiros trabalhos envolvendo a preparação de eletrodos com superfícies modificadas surgiram somente no início da década de 70. Até então, só eram utilizados eletrodos de materiais ditos “inertes” tais como ouro, platina, carbono e mercúrio (SOUZA, 1997).

O conceito de eletrodo quimicamente modificado foi inicialmente utilizado na eletroquímica em 1975 por Murray e colaboradores, para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas convenientemente imobilizadas na superfície destes dispositivos (MOSES, WIER e MURRAY, 1975). O principal objetivo desta modificação é pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução como uma forma de alterar a reatividade e seletividade do sensor base, favorecendo assim, o desenvolvimento de eletrodos para vários fins e aplicações, desde catálise de reações orgânicas e inorgânicas (KATZ, LÖTZBEYER, SCHLERETH *et al.*, 1994) até a transferência de elétrons em moléculas de interesse (PERSSON, BJÖRN, 1990).

Lane e Hubbard (1973) foram os pioneiros na realização da modificação de superfície de eletrodos. Estes pesquisadores adsorveram na superfície de eletrodos de platina várias olefinas funcionalizadas, explorando a propensão de grupos alceno quimisorverem-se sobre este metal (LANE e HUBBARD, 1973). Em 1975 foi publicado um trabalho descrevendo

a construção de um eletrodo quiral para a eletrossíntese de álcoois a partir da redução de cetonas. Aminoácidos opticamente ativos foram covalentemente ligados à superfície de um eletrodo de carbono vítreo, via grupos carboxila (WATKINS, BEHLING, KARIV *et al.*, 1975). Ainda em 1975, Murray fez a modificação química da superfície de eletrodos de SnO<sub>2</sub> via organosilanos (MOSES, WIER e MURRAY, 1975).

A modificação da superfície dos eletrodos por deposição de materiais funcionalizados tem recebido considerável atenção nas últimas três décadas, devido à possibilidade de gerar dispositivos para diversas aplicações, incluindo eletrocatalise (GRIESE, KAMPOURIS, KADARA *et al.*, 2008; MALINAUSKAS, 1999), membranas (LOJOU e BIANCO, 2004) e biossensores com alta sensibilidade e seletividade (AHUJA, MIR e KUMAR, 2007; GERARD, CHAUBEY e MALHOTRA, 2002).

As técnicas utilizadas atualmente na deposição de filmes em diferentes áreas são diversas. A eletropolimerização é a mais utilizada para a construção de biossensores (PEREIRA, SANTOS e KUBOTA, 2002; SILVA, FERREIRA, SOUZA *et al.*, 2009). A vantagem deste método é o controle da deposição eletroquímica do filme, como espessura, morfologia e homogeneidade na formação da cadeia polimérica, variando o potencial e o número de varreduras no eletrodo de trabalho (SADKI, SCHOTTLAND, BRODIE *et al.*, 2000). Desta forma, a tecnologia eletroquímica tem sido aplicada de forma significativa na produção de eletrodos modificados devido à simplicidade e vantagem de se obter polímeros condutores sendo simultaneamente dopados (VIEIRA, FERREIRA, FRANCO *et al.*, 2006; XIE, JIANG, XU *et al.*, 2009).

A modificação do eletrodo visa melhorar a sensibilidade, seletividade e estabilidade, permitindo a adaptação de sua resposta, a fim de atender às necessidades analíticas (BRITO-MADURRO, FERREIRA, VIEIRA *et al.*, 2007). Desta forma, os filmes poliméricos têm sido empregados na modificação de superfícies de eletrodos para o desenvolvimento de biossensores com a finalidade de proteger a superfície dos eletrodos contra impurezas (PERSSON, LAN, GORTON *et al.*, 1993), bloquear interferentes (ALVAREZ-ICAZA e BILITEWSKI, 1993), incorporar mediadores (GARCIA, OLIVEIRA NETO e KUBOTA, 1998) e conferir biocompatibilidade (PEREIRA, SANTOS e KUBOTA, 2002; RATNER, 1995).

O uso de filmes poliméricos oferece várias vantagens na construção de sensores e biossensores, visto que são materiais relativamente baratos, as técnicas para a produção são simples, podem ser depositados em diversos tipos de substratos e a escolha de diferentes



estruturas moleculares propicia a construção de filmes com características diferenciadas (SILVA, FERREIRA, SOUZA *et al.*, 2009).



## REFERÊNCIAS

- AFONSO, A. S.; ZANETTI, B. F.; SANTIAGO, A. C.; HENRIQUE-SILVA, F. QCM immunoassay for recombinant cysteine peptidase: A potential protein biomarker for diagnosis of citrus canker. **Talanta**, v. 104, p. 193-197, 2013.
- AHMED, A.; RUSHWORTH, J. V.; WRIGHT, J. D.; MILLNER, P. A. Novel impedimetric immunosensor for detection of pathogenic bacteria *Streptococcus pyogenes* in human saliva. **Analytical chemistry**, v. 85, n. 24, p. 12118-12125, 2013.
- AHUJA, T.; MIR, I. A.; KUMAR, D. Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. **Biomaterials**, v. 28, n. 5, p. 791-805, 2007.
- ALCON, S.; TALARMIN, A.; DEBRUYNE, M.; FALCONAR, A. . Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 2, p. 376-381, 2002.
- ALSALHI, M. S.; ALAM, J.; DASS, L. A.; RAJA, M. Recent advances in conjugated polymers for light emitting devices. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 3, p. 2036-2054, 2011.
- ALVAREZ-ICAZA, M.; BILITEWSKI, U. Mass production of biosensors. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 11, p. 525A-533A, 1993.
- ALVES, M. R. A.; CALADO, H. D. R.; MATENCIO, T.; DONNICI, C. L. Oligômeros e polímeros derivados do tiofeno: síntese e aplicações. **Quim. Nova**, v. 33, n. 10, p. 2165-2175, 2010.
- AMADO, F. D.; SILVEIRA, C. C.; RODRIGUES JR, L. F.; FERREIRA, C. A. Estudo da obtenção através de síntese eletroquímica de poliaminonaftalenos e poliaminoantracenos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 18, n. 3, 2008.
- ANGELO, A. Electrode surface modifications improve cathode hydrogen production and anode capacity in Ni–MH batteries. **International journal of hydrogen energy**, v. 31, n. 2, p. 301-302, 2006.
- ARORA, K.; PRABHAKAR, N.; CHAND, S.; MALHOTRA, B. Ultrasensitive DNA hybridization biosensor based on polyaniline. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, n. 5, p. 613-620, 2007.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Fundamentals and Applications**, New York: Wiley, 2001: Springer 2002.
- BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. D. G. L. C. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. 2008.

BATAILLARD, P.; GARDIES, F.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; MARTELET, C. Direct detection of immunospecies by capacitance measurements. **Analytical chemistry**, v. 60, n. 21, p. 2374-2379, 1988.

BENJAMIN, D. C.; BERZOFKY, J. A.; EAST, I. J.; GURD, F. R. The antigenic structure of proteins: a reappraisal. **Annual review of immunology**, v. 2, n. 1, p. 67-101, 1984.

BERNIUS, M. T.; INBASEKARAN, M.; O'BRIEN, J.; WU, W. Progress with light-emitting polymers. **Advanced Materials**, v. 12, n. 23, p. 1737-1750, 2000.

BLANCO-LOPEZ, M.; LOBO-CASTANON, M.; MIRANDA-ORDIERES, A.; TUNON-BLANCO, P. Voltammetric sensor for vanillylmandelic acid based on molecularly imprinted polymer-modified electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, n. 4, p. 353-362, 2003.

BLANKESPOOR, R. L.; MILLER, L. L. Polymerized 3-methoxythiophen. A processable material for the controlled release of anions. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 2, p. 90-92, 1985.

BOROLE, D. D.; KAPADI, U.; MAHULIKAR, P.; HUNDIWALE, D. Conducting polymers: an emerging field of biosensors. **Designed monomers and polymers**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde. Dengue: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento. **Série A. Normas e Manuais Técnicos**. Fundação Nacional de Saúde (Funasa), Brasília, n. 176, p. 1-20, 2002.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Dengue: diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança. **Série A. Normas e Manuais Técnicos**. 2ª edição. Brasília, 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Dengue: diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança. **Série A. Normas e Manuais Técnicos**. 3ª edição. Brasília, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe Epidemiológico da Dengue - Análise de Situação e Tendências - 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue e febre de chikungunya até a Semana Epidemiológica (SE) 53 de 2014. v. 46, n. 3. Jan. 2015. **Boletim Epidemiológico**. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/19/2015-002---BE-at---SE-53.pdf>. Acesso em: 04 jun. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016. v. 48, n. 3. Abr. 2017. **Boletim Epidemiológico**. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/abril/06/2017-002-Monitoramento-dos-casos-de-dengue--febre-de-chikungunya-e-febre-pelo-v--rus-Zika-ate-a-Semana-Epidemiologica-52--2016.pdf>. Acesso em: 04 jun. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2018. v. 50, n. 4. Jan. 2019. **Boletim Epidemiológico**. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/2019-002.pdf>. Acesso em: 04 jun. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 12 de 2019 e Levantamento Rápido de Índices para Aedes aegypti (LIRAA). v. 50, n. 13. Abr. 2019. **Boletim Epidemiológico**. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/abril/30/2019-013-Monitoramento-dos-casos-de-arboviroses-urbanas-transmitidas-pelo-Aedes-publicacao.pdf>. Acesso em: 04 jun. 2019.

BRECHT, A.; PIEHLER, J.; LANG, G.; GAUGLITZ, G. A direct optical immunosensor for atrazine detection. **Analytica chimica acta**, v. 311, n. 3, p. 289-299, 1995.

BREDAS, J. L.; STREET, G. B. Polarons, bipolarons, and solitons in conducting polymers. **Accounts of Chemical Research**, v. 18, n. 10, p. 309-315, 1985.

BRITO-MADURRO, A. G.; FERREIRA, L. F.; VIEIRA, S. N.; ARIZA, R. G. Immobilization of purine bases on a poly-4-aminophenol matrix. **Journal of materials science**, v. 42, n. 9, p. 3238-3243, 2007.

BUDNIKOV, H. C.; EVTUGYN, G. A.; PORFIREVA, A. V. Electrochemical DNA sensors based on electropolymerized materials. **Talanta**, v. 102, p. 137-155, 2012.

BULL, R.; FAN, F. R.; BARD, A. Polymer Films on Electrodes 13. Incorporation of Catalysts into Electronically Conductive Polymers: Iron Phthalocyanine in Polypyrrole. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 131, n. 3, p. 687-689, 1984.

BUSH, D. L.; RECHNITZ, G. A. Monoclonal antibody biosensor for antigen monitoring. **Analytical letters**, v. 20, n. 11, p. 1781-1790, 1987.

CALVO-PÉREZ, A.; DOMÍNGUEZ-RENEDO, O.; ALONSO-LOMILLO, M. A.; ARCOS-MARTÍNEZ, M. J. Disposable amperometric biosensor for the determination of tyramine using plasma amino oxidase. **Microchimica Acta**, v. 180, n. 3-4, p. 253-259, 2013.

CAMARA, A. R.; GOUVÊA, P. M.; DIAS, A. C. M.; BRAGA, A. M. Dengue immunoassay with an LSPR fiber optic sensor. **Optics express**, v. 21, n. 22, p. 27023-27031, 2013.

CASTILLO, J.; GÁSPÁR, S.; LETH, S.; NICULESCU, M. Biosensors for life quality: Design, development and applications. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 102, n. 2, p. 179-194, 2004.

CASTLEBERRY, J. S.; MAHON, C. R. Dengue fever in the Western Hemisphere. **Clinical Laboratory Science**, v. 16, n. 1, p. 34, 2003.

CAVALCANTI, I. T.; GUEDES, M. I.; SOTOMAYOR, M. D.; YAMANAKA, H. A label-free immunosensor based on recordable compact disk chip for early diagnostic of the dengue virus infection. **Biochemical engineering journal**, v. 67, p. 225-230, 2012.

CECCHETTO, J.; CARVALHO, F. C.; SANTOS, A.; FERNANDES, F. C. An impedimetric biosensor to test neat serum for dengue diagnosis. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 213, p. 150-154, 2015.

CHAMBERS, T. J.; HAHN, C. S.; GALLER, R.; RICE, C. M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual review of microbiology**, v. 44, n. 1, p. 649-688, 1990.

CHAUBEY, A.; GERARD, M.; SINGHAL, R.; SINGH, V. Immobilization of lactate dehydrogenase on electrochemically prepared polypyrrole-polyvinylsulphonate composite films for application to lactate biosensors. **Electrochimica Acta**, v. 46, n. 5, p. 723-729, 2001.

CHEN, S.-M.; FA, Y.-H. The electropolymerization and electrocatalytic properties of polymerized new fuchsin film modified electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 553, p. 63-75, 2003.

CHRISTINE, E. S.; VENKATRAM, R. S.; JOSEPH, P. V.; ROBERT, L. Stimulation of neurite outgrowth using an electrically conducting polymer. **Appl Biol Sci**, v. 94, n. 17, p. 8, 1997.

CIVIT, L.; FRAGOSO, A.; O'SULLIVAN, C. Electrochemical biosensor for the multiplexed detection of human papillomavirus genes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 4, p. 1684-1687, 2010.

COAKLEY, K. M.; MCGEHEE, M. D. Conjugated polymer photovoltaic cells. **Chemistry of materials**, v. 16, n. 23, p. 4533-4542, 2004.

CORDEIRO, T. A.; GONÇALVES, M. V.; FRANCO, D. L.; REIS, A. B. Label-free electrochemical impedance immunosensor based on modified screen-printed gold electrodes for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Talanta**, v. 195, p. 327-332, 2019.

COSNIER, S.; HOLZINGER, M. Electrosynthesized polymers for biosensing. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 5, p. 2146-2156, 2011.

CUNHA, M. P.; GUIMARÃES, V. N.; SOUZA, M.; DE PAULA CARDOSO, D. D. D. Phylodynamics of DENV-1 reveals the spatiotemporal co-circulation of two distinct lineages in 2013 and multiple introductions of dengue virus in Goiás, Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 43, p. 130-134, 2016.

D'ERAMO, F.; ZÓN, M. A.; FERNÁNDEZ, H.; SERENO, L. Studies of a novel conducting polymer by cyclic and square wave voltammetries: Its synthesis and characterization. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 24, p. 7182-7190, 2008.

DANIELS, J. S.; POURMAND, N. Label-free impedance biosensors: Opportunities and challenges. **Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis**, v. 19, n. 12, p. 1239-1257, 2007.

DAVIES, D. R.; METZGER, H. Structural basis of antibody function. **Annual review of immunology**, v. 1, n. 1, p. 87-115, 1983.

DESHPANDE, M.; AMALNERKAR, D. Biosensors prepared from electrochemically-synthesized conducting polymers. **Progress in polymer science**, v. 18, n. 4, p. 623-649, 1993.

DIAS, A. C. M.; GOMES-FILHO, S. L.; SILVA, M. M.; DUTRA, R. F. A sensor tip based on carbon nanotube-ink printed electrode for the dengue virus NS1 protein. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 44, p. 216-221, 2013.

DIAS, L. B.; ALMEIDA, S. C.; HAES, T. M.; MOTA, L. M. Dengue: transmissão, aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 43, n. 2, p. 143-152, 2010.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; VON ZUBEN, A. P. B. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, p. 1-6, 2017.

DYE, C. The analysis of parasite transmission by bloodsucking insects. **Annual review of entomology**, v. 37, n. 1, p. 1-19, 1992.

EDELING, M. A.; DIAMOND, M. S.; FREMONT, D. H. Structural basis of Flavivirus NS1 assembly and antibody recognition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 11, p. 4285-4290, 2014.

FAEZ, R.; REZENDE, M. C.; MARTIN, I. M.; DE PAOLI, M.-A. Polímeros condutores intrínsecos e seu potencial em blindagem de radiações eletromagnéticas. **Polímeros**, 2000.

FELIX, F. S.; ANGNES, L. Electrochemical immunosensors – a powerful tool for analytical applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 102, p. 470-478, 2018.

FERRAZ, R. R. N.; BARNABÉ, A. S.; QUONIAM, L.; SANTOS, A. M. D. Aspectos históricos da criação dos grupos de pesquisa em dengue no Brasil com a utilização da ferramenta computacional ScriptGP. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, p. 837-848, 2018.

FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. Direct electron transfer: an approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 230-243, 2003.

GARCIA, C.; DE OLIVEIRA NETO, G.; KUBOTA, L. New fructose biosensors utilizing a polypyrrole film and D-fructose 5-dehydrogenase immobilized by different processes. **Analytica chimica acta**, v. 374, n. 2-3, p. 201-208, 1998.

GARCÍA, M. A. A. V.; BLANCO, P. T.; IVASKA, A. A poly(o-aminophenol) modified electrode as an amperometric hydrogen peroxide biosensor. **Electrochimica acta**, v. 43, n. 23, p. 3533-3539, 1998.

GARDNER, J. W.; BARTLETT, P. Design of conducting polymer gas sensors: modelling and experiment. **Synthetic Metals**, v. 57, n. 1, p. 3665-3670, 1993.

GENIES, E.; LAPKOWSKI, M. Spectroelectrochemical study of polyaniline versus potential in the equilibrium state. **Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry**, v. 220, n. 1, p. 67-82, 1987.

GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. Application of conducting polymers to biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, n. 5, p. 345-359, 2002.

GEURTS, J. Analysis of band bending at III–V semiconductor interfaces by Raman spectroscopy. **Surface science reports**, v. 18, n. 1-3, p. 1-89, 1993.

GIL, E. D. S.; KUBOTA, L. T.; YAMAMOTO, Y. I. Alguns aspectos de imunoenaios aplicados à química analítica. **Química nova**, 1999.

GIROTTO, E. M.; DE PAOLI, M.-A. Transporte de massa em polímeros intrinsecamente condutores: importância, técnicas e modelos teóricos. **Química nova**, v. 22, n. 3, p. 358-368, 1999.

GRIESE, S.; KAMPOURIS, D. K.; KADARA, R. O.; BANKS, C. E. A critical review of the electrocatalysis reported at C60 modified electrodes. **Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis**, v. 20, n. 14, p. 1507-1512, 2008.

GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VOEROES, J.; REIMHULT, E. Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures. **Sensors**, v. 8, n. 3, p. 1400-1458, 2008.

GUAN, J.-G.; MIAO, Y.-Q.; ZHANG, Q.-J. Impedimetric biosensors. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 97, n. 4, p. 219-226, 2004.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUY, B.; SAVILLE, M.; LANG, J.; SIQUEIRA JR, J. B. Desenvolvimento de uma vacina tetravalente contra dengue. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 2, n. 2, p. 51-64, 2011.

GUZMAN, M. G.; HALSTEAD, S. B.; ARTSOB, H.; BUCHY, P. Dengue: a continuing global threat. **Nature reviews microbiology**, v. 8, n. 12supp, p. S7, 2010.

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 476-481, 1988.

HALSTEAD, S. B. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. **Adv virus res**, v. 60, p. 421-467, 2003.

HALSTEAD, S. B. Dengue. **The Lancet**, v. 370, n. 9599, p. 1644-1652, 2007.

HAMMON, W. M.; RUNDNICK, A.; SATHER, G. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. **Science**, v. 131, n. 3407, p. 1102-1103, 1960.



HAUSCHILD, A.; KARKI, K.; COWIE, B.; ROHLFING, M. Molecular distortions and chemical bonding of a large  $\pi$ -conjugated molecule on a metal surface. **Physical Review Letters**, v. 94, n. 3, p. 036106, 2005.

HIRST, E. R.; YUAN, Y. J.; XU, W.; BRONLUND, J. Bond-rupture immunosensors - a review. **Biosensors and bioelectronics**, v. 23, n. 12, p. 1759-1768, 2008.

HOLMES, E. C. Molecular epidemiology and evolution of emerging infectious diseases. **British medical bulletin**, v. 54, n. 3, p. 533-543, 1998.

HOSSEINI, M.; BAGHERI, R.; NAJJAR, R. Electropolymerization of polypyrrole and polypyrrole-ZnO nanocomposites on mild steel and its corrosion protection performance. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 121, n. 6, p. 3159-3166, 2011.

HOWE, G. M. **A world geography of human diseases**. Academic Press Inc.(London) Ltd., 24/28 Oval Road, London NW1 7DX., 1977. ISBN 0123571502.

INNIS, B.; NISALAK, A.; NIMMANNITYA, S.; KUSALERDCHARIYA, S. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 40, n. 4, p. 418-427, 1989.

ISMAIL, K. M.; KHALIFA, Z. M.; AZZEM, M. A.; BADAWY, W. A. Electrochemical preparation and characterization of poly (1-amino-9, 10-anthraquinone) films. **Electrochimica acta**, v. 47, n. 12, p. 1867-1873, 2002.

JACOBS, M.; YOUNG, P. Dengue vaccines: preparing to roll back dengue. **Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000)**, v. 4, n. 2, p. 168-171, 2003.

JIANG, J.; KUCERNAK, A. Nanostructured platinum as an electrocatalyst for the electrooxidation of formic acid. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 520, n. 1-2, p. 64-70, 2002.

JOHNSON, A.; SONG, Q.; KO FERRIGNO, P.; BUENO, P. R. Sensitive affimer and antibody based impedimetric label-free assays for C-reactive protein. **Analytical chemistry**, v. 84, n. 15, p. 6553-6560, 2012.

JOHNSON, B.; READ, D.; CHRISTENSEN, P.; HAMNETT, A. Impedance characteristics of conducting polythiophene films. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 364, n. 1-2, p. 103-109, 1994.

JONES, G.; WORTBERG, M.; ROCKE, D. M.; HAMMOCK, B. D. Immunoassay of cross-reacting analytes. **ACS Symposium Series**, 1997.

JÚNIOR, L. R.; NETO, G.; KUBOTA, L. Transdutores potenciométricos a base de polímeros condutores: aplicações analíticas. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 519, 1997.

KAMAT, P. V.; FOX, M. A. Dye Loaded Polymer Electrodes III. Generation of Photogalvanic Effects at Electrodes Coated with Poly (4-Vinyl Pyridine) Films Containing Rose Bengal. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 131, n. 5, p. 1032-1037, 1984.

KANATZIDIS, M. Polymeric electrical conductors. **Chemical and Engineering News**, v. 1990, p. 36-54, 1990.

KARPAKAM, V.; KAMARAJ, K.; SATHIYANARAYANAN, S.; VENKATACHARI, G. Electrosynthesis of polyaniline–molybdate coating on steel and its corrosion protection performance. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 5, p. 2165-2173, 2011.

KARYAKIN, A. A.; VUKI, M.; LUKACHOVA, L. V.; KARYAKINA, E. E. Processible polyaniline as an advanced potentiometric pH transducer. Application to biosensors. **Analytical chemistry**, v. 71, n. 13, p. 2534-2540, 1999.

KATZ, E.; LÖTZBEYER, T.; SCHLERETH, D. D.; SCHUHMANN, W. Electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide coenzymes at gold and platinum electrode surfaces modified with a monolayer of pyrroloquinoline quinone. Effect of Ca<sup>2+</sup> cations. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 373, n. 1-2, p. 189-200, 1994.

KATZ, E.; WILLNER, I. Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: routes to impedimetric immunosensors, DNA-sensors, and enzyme biosensors. **Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis**, v. 15, n. 11, p. 913-947, 2003.

KILMARTIN, P. A.; WRIGHT, G. A. Photoeffects to characterise polypyrrole electrodes and bilayers with polyaniline. **Electrochimica acta**, v. 46, n. 18, p. 2787-2794, 2001.

KIM, S.-H.; CHOI, S.-W.; SUH, H.-J.; JIN, S.-H. Surface plasmon resonance spectroscopy on the interaction of a self-assembled monolayer with linear hydrocarbon such as pentane, hexane, heptane and octane. **Dyes and pigments**, v. 55, n. 1, p. 17-25, 2002.

KOURI, G. Dengue: an update. **Lancet Infect Dis**, v. 2, p. 33-42, 2002.

KOURÍ, G. P.; GUZMÁN, M. G.; BRAVO, J. R. Dengue hemorrágico en Cuba: crónica de una epidemia. 1986.

KUMARASAMY, V.; WAHAB, A. A.; CHUA, S.; HASSAN, Z. Evaluation of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for laboratory diagnosis of acute dengue virus infection. **Journal of virological methods**, v. 140, n. 1-2, p. 75-79, 2007.

KUNO, G.; GOMEZ, I.; GUBLER, D. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. **Journal of virological methods**, v. 33, n. 1-2, p. 101-113, 1991.

LANCIOTTI, R. S.; CALISHER, C. H.; GUBLER, D. J.; CHANG, G.-J. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Journal of clinical microbiology**, v. 30, n. 3, p. 545-551, 1992.

LANE, R. F.; HUBBARD, A. T. Electrochemistry of chemisorbed molecules. I. Reactants connected to electrodes through olefinic substituents. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 77, n. 11, p. 1401-1410, 1973.

LEE, T.-Y.; SHIM, Y.-B. Direct DNA hybridization detection based on the oligonucleotide-functionalized conductive polymer. **Analytical chemistry**, v. 73, n. 22, p. 5629-5632, 2001.

LEI, Y.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A. Microbial biosensors. **Analytica chimica acta**, v. 568, n. 1-2, p. 200-210, 2006.

LI, C.; BAI, H.; SHI, G. Conducting polymer nanomaterials: electrosynthesis and applications. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 8, p. 2397-2409, 2009.

LIBRATY, D. H.; ENDY, T. P.; HOUNG, H.-S. H.; GREEN, S. Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. **Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 9, p. 1213-1221, 2002.

LIN, J.; JU, H. Electrochemical and chemiluminescent immunosensors for tumor markers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 8, p. 1461-1470, 2005.

LISDAT, F.; SCHÄFER, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 391, n. 5, p. 1555, 2008.

LOJOU, E.; BIANCO, P. Membrane electrodes for protein and enzyme electrochemistry. **Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis**, v. 16, n. 13-14, p. 1113-1121, 2004.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.

LUPI, O.; CARNEIRO, C. G.; COELHO, I. C. B. Manifestações mucocutâneas da dengue. **An Bras Dermatol**, v. 82, n. 4, p. 291-305, 2007.

LUPI, O.; TYRING, S. K. Tropical dermatology: viral tropical diseases. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 49, n. 6, p. 979-1000, 2003.

MACDIARMID, A.; YANG, L.; HUANG, W.; HUMPHREY, B. Polyaniline: Electrochemistry and application to rechargeable batteries. **Synthetic Metals**, v. 18, n. 1-3, p. 393-398, 1987.

MACDIARMID, A. G. Synthetic metals: a novel role for organic polymers. **Current applied physics**, v. 1, n. 4-5, p. 269-279, 2001.

MACDONALD, J. R.; BARSOUKOV, E. Impedance spectroscopy: theory, experiment, and applications. **History**, v. 1, n. 8, p. 1-13, 2005.

MAIA, D. J.; DE PAOLI, M.-A.; ALVES, O. L.; ZARBIN, A. J. Síntese de polímeros condutores em matrizes sólidas hospedeiras. **Química Nova**, 2000.

MALHOTRA, B. D.; CHAUBEY, A.; SINGH, S. Prospects of conducting polymers in biosensors. **Analytica chimica acta**, v. 578, n. 1, p. 59-74, 2006.

MALINAUSKAS, A. Electrocatalysis at conducting polymers. **Synthetic Metals**, v. 107, n. 2, p. 75-83, 1999.

MARTINEZ-TORRES, M. Dengue hemorrágico em crianças: editorial. **Havana: José Martí**, v. 180, 1990.

MASERA, D. C.; SCHENKEL, G. C.; DA SILVA, L. L.; SPANHOL, M. R. Febre hemorrágica da dengue: aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais de uma arbovirose. **Revista Conhecimento Online**, v. 2, p. 60-81, 2011.

MATTOSO, L. H. C. Polianilinas: síntese, estrutura e propriedades. **Química nova**, v. 19, n. 4, p. 388-399, 1996.

MCQUADE, D. T.; PULLEN, A. E.; SWAGER, T. M. Conjugated polymer-based chemical sensors. **Chemical Reviews**, v. 100, n. 7, p. 2537-2574, 2000.

MEDEIROS, E. S.; OLIVEIRA, J. E.; CONSOLIN-FILHO, N.; PATERNO, L. Uso de Polímeros Condutores em Sensores. Parte 2: Aplicações em Sensores. **Embrapa Instrumentação-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2012.

MEDYANTSEVA, E.; VERTLIB, M.; BUDNIKOV, G.; BABKINA, S. Amperometric biochemical sensor based on immobilised cholinesterase in the immunoassay of pesticides. **Journal of analytical chemistry**, v. 50, n. 7, p. 719-722, 1995.

MELAMED, S.; ELAD, T.; BELKIN, S. Microbial sensor cell arrays. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 2-8, 2012.

MIAGOSTOVICH, M. P.; SANTOS, F. B. D.; FUMIAN, T. M.; GUIMARÃES, F. R. Complete genetic characterization of a Brazilian dengue virus type 3 strain isolated from a fatal outcome. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 307-313, 2006.

MIKKELSEN, S.; CORTÓN, E. Centrifugation methods. **Bioanalytical chemistry. New Jersey: John Wiley & Sons**, p. 247-67, 2004.

MILLER, J. S. Conducting polymers - materials of commerce. **Advanced Materials**, v. 5, n. 9, p. 671-676, 1993.

MOHAMMED, M.-I.; DESMULLIEZ, M. P. Lab-on-a-chip based immunosensor principles and technologies for the detection of cardiac biomarkers: a review. **Lab on a Chip**, v. 11, n. 4, p. 569-595, 2011.

MOSES, P.; WIER, L.; MURRAY, R. Chemically modified tin oxide electrode. **Analytical Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 1882-1886, 1975.

MUÑOZ, E.; COLINA, Á.; HERAS, A.; RUIZ, V. Electropolymerization and characterization of polyaniline films using a spectroelectrochemical flow cell. **Analytica chimica acta**, v. 573, p. 20-25, 2006.

MURRAY, R. **Techniques of chemistry: molecular design of electrode surfaces**: Wiley-Interscience Hoboken 1992.

MUSTAFA, M.; RASOTGI, V.; JAIN, S.; GUPTA, V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 71, n. 1, p. 67-70, 2015.

NATTA, G.; MAZZANTI, G.; CORRADINI, P. Atti Accad. Naz. Lincei, Cl. **Sci. Fis., Mat. Nat., Rend.**, v. 25, n. 3, 1958.

NAWAZ, M. H.; HAYAT, A.; CATANANTE, G.; LATIF, U. Development of a portable and disposable NS1 based electrochemical immunosensor for early diagnosis of dengue virus. **Analytica chimica acta**, v. 1026, p. 1-7, 2018.

NESTOROWICZ, A.; CHAMBERS, T. J.; RICE, C. M. Mutagenesis of the yellow fever virus NS2A/2B cleavage site: effects on proteolytic processing, viral replication, and evidence for alternative processing of the NS2A protein. **Virology**, v. 199, n. 1, p. 114-123, 1994.

NOGUEIRA, R. M. R.; SCHATZMAYR, H. G.; DE FILIPPIS, A. M. B.; DOS SANTOS, F. B. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 9, p. 1376, 2005.

OH, S.; KIM, D. W.; LEE, C.; LEE, M.-H. Poly (vinylpyridine-co-styrene) based in situ cross-linked gel polymer electrolyte for lithium-ion polymer batteries. **Electrochimica Acta**, v. 57, p. 46-51, 2011.

OKABAYASHI, K.; GOTO, F.; ABE, K.; YOSHIDA, T. Electrochemical studies of polyaniline and its application. **Synthetic Metals**, v. 18, n. 1-3, p. 365-370, 1987.

OLIVEIRA, J. E.; CONSOLIN-FILHO, N.; PATERNO, L.; MATTOSO, L. Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 3: Biossensores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 8, n. 1, 2013.

OLIVEIRA, R. M.; VIEIRA, S. N.; ALVES, H. C.; FRANÇA, E. G. Electrochemical and morphological studies of an electroactive material derived from 3-hydroxyphenylacetic acid: a new matrix for oligonucleotide hybridization. **Journal of Materials Science**, v. 45, n. 2, p. 475, 2010.

PALACIO, M. L.; BHUSHAN, B. Enzyme adsorption on polymer-based confined bioinspired biosensing surface. **Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films**, v. 30, n. 5, p. 050607, 2012.

PARK, B.-W.; YOON, D.-Y.; KIM, D.-S. Recent progress in bio-sensing techniques with encapsulated enzymes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 1, p. 1-10, 2010.

PAROLO, C.; MERKOÇI, A. based nanobiosensors for diagnostics. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 2, p. 450-457, 2013.

PATIL, A.; HEEGER, A.; WUDL, F. Optical properties of conducting polymers. **Chemical Reviews**, v. 88, n. 1, p. 183-200, 1988.

PAVEY, K. D.; HUNTER, A. C.; PAUL, F. Real-time evaluation of macromolecular surface modified quartz crystal resonant sensors under cryogenic stress for biological applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, n. 11, p. 1349-1354, 2003.

PENG, H.; ZHANG, L.; SPIRES, J.; SOELLER, C. Synthesis of a functionalized polythiophene as an active substrate for a label-free electrochemical genosensor. **Polymer**, v. 48, n. 12, p. 3413-3419, 2007.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. D. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, 2002.

PERSSON, B. A chemically modified graphite electrode for electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide based on a phenothiazine derivative, 3- $\beta$ -naphthoyl-toluidine blue O. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 287, n. 1, p. 61-80, 1990.

PERSSON, B.; LAN, H.; GORTON, L.; OKAMOTO, Y. Amperometric biosensors based on electrocatalytic regeneration of NAD<sup>+</sup> at redox polymer-modified electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 8, n. 2, p. 81-88, 1993.

PIMENTA, T. C.; SANTOS, C. C.; THOMASINI, R. L.; FERREIRA, L. F. Impedimetric immunosensor for dengue diagnosis using graphite screen-printed electrodes coated with poly (4-aminophenylacetic acid). **Biomedical microdevices**, v. 20, n. 3, p. 78, 2018.

PINHEIRO, F. D. P. Los programas de erradicacion y de control del Aedes aegypti en las Americas. Task Force sobre el Aedes Aegypti. **Organización Panamericana de la Salud**. 1996.

PIRO, B.; HACCOUN, J.; PHAM, M.; TRAN, L. Study of the DNA hybridization transduction behavior of a quinone-containing electroactive polymer by cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 577, n. 1, p. 155-165, 2005.

PRISSANAROON-OUAJAI, W.; PIGRAM, P. J.; JONES, R.; SIRIVAT, A. A novel pH sensor based on hydroquinone monosulfonate-doped conducting polypyrrole. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 135, n. 1, p. 366-374, 2008.

PRODROMIDIS, M. I. Impedimetric immunosensors - A review. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 14, p. 4227-4233, 2010.

QI, P.; WAN, Y.; ZHANG, D. Impedimetric biosensor based on cell-mediated bioimprinted films for bacterial detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 39, n. 1, p. 282-288, 2013.

RAMANATHAN, K.; BANGAR, M. A.; YUN, M.; CHEN, W. Bioaffinity sensing using biologically functionalized conducting-polymer nanowire. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 2, p. 496-497, 2005.

RAMANATHAN, K.; PANDEY, S. S.; KUMAR, R.; GULATI, A. Covalent immobilization of glucose oxidase to poly (O-amino benzoic acid) for application to glucose biosensor. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 78, n. 3, p. 662-667, 2000.

RATNER, B. D. Surface modification of polymers: chemical, biological and surface analytical challenges. **Biosensors and bioelectronics**, v. 10, n. 9-10, p. 797-804, 1995.

REEVES, S. G.; SIEBERT, S. T. A.; ROBERTS, M. A.; DURST, R. A. Liposome immunosensing devices for environmental contaminant screening. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 14, n. 7, p. 351-355, 1995.

RIBAS-SILVA, R. C.; EID, A. A. Dengue antibodies in blood donors. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 34, n. 3, p. 193-195, 2012.

RICCARDI, C. S.; COSTA, P. I.; YAMANAKA, H. Imunossensor amperométrico. **Química Nova**, p. 316-320, 2002.

RICCARDI, C. S.; DAHMOUCHE, K.; SANTILLI, C. V.; COSTA, P. I. Immobilization of streptavidin in sol-gel films: application on the diagnosis of hepatitis C virus. **Talanta**, v. 70, n. 3, p. 637-643, 2006.

RICCI, F.; ADORNETTO, G.; PALLESCHI, G. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. **Electrochimica Acta**, v. 84, p. 74-83, 2012.

RONCALI, J. Conjugated poly (thiophenes): synthesis, functionalization, and applications. **Chemical Reviews**, v. 92, n. 4, p. 711-738, 1992.

RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical biosensors. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 5, p. 1747-1763, 2010.

SABCHAREON, A.; WALLACE, D.; SIRIVICHAYAKUL, C.; LIMKITTIKUL, K. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. **The Lancet**, v. 380, n. 9853, p. 1559-1567, 2012.

SADIK, O.; WALLACE, G. Pulse damperometric detection of proteins using antibody containing conducting polymers. **Analytica chimica acta**, v. 279, n. 2, p. 209-212, 1993.

SADKI, S.; SCHOTTLAND, P.; BRODIE, N.; SABOURAUD, G. The mechanisms of pyrrole electropolymerization. **Chemical Society Reviews**, v. 29, n. 5, p. 283-293, 2000.

SANDBERG, R.; VAN HOUTEN, L.; SCHWARTZ, J.; BIGLIANO, R. A conductive polymer-based immunosensor for the analysis of pesticide residues. ACS symposium series (USA), 1992.

SANKARAN, B.; REYNOLDS, J. R. High-contrast electrochromic polymers from alkyl-derivatized poly (3, 4-ethylenedioxythiophenes). **Macromolecules**, v. 30, n. 9, p. 2582-2588, 1997.

SANTHANAM, K. Conducting polymers for biosensors: Rationale based on models. **Pure and applied chemistry**, v. 70, n. 6, p. 1259-1262, 1998.

SANTOS, A. D. S.; GORTON, L.; KUBOTA, L. T. Nile blue adsorbed onto silica gel modified with niobium oxide for electrocatalytic oxidation of NADH. **Electrochimica acta**, v. 47, n. 20, p. 3351-3360, 2002.

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 3, p. 489-511, 2012.

SCATURRO, P.; CORTESE, M.; CHATEL-CHAIX, L.; FISCHL, W. Dengue virus non-structural protein 1 modulates infectious particle production via interaction with the structural proteins. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 11, p. e1005277, 2015.

SCHLICHTIGER, A.; BAIER, C.; YIN, M.-X.; HOLMES, A. B. Covalent attachment of functionalized cardiolipin on a biosensor gold surface allows repetitive measurements of anticardiolipin antibodies in serum. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 405, n. 1, p. 275-285, 2013.

SCHUHMANN, W.; LEHN, C.; SCHMIDT, H.-L.; GRÜNDIG, B. Comparison of native and chemically stabilized enzymes in amperometric enzyme electrodes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 7, n. 1-3, p. 393-398, 1992.

SCHWARTZ, B. J. Conjugated polymers as molecular materials: How chain conformation and film morphology influence energy transfer and interchain interactions. **Annual review of physical chemistry**, v. 54, n. 1, p. 141-172, 2003.

SCHWEISS, R.; WERNER, C.; KNOLL, W. Impedance spectroscopy studies of interfacial acid-base reactions of self-assembled monolayers. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 540, p. 145-151, 2003.

SETHI, R. S. Transducer aspects of biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 9, n. 3, p. 243-264, 1994.

SHARMA, S. K.; SEHGAL, N.; KUMAR, A. Biomolecules for development of biosensors and their applications. **Current Applied Physics**, v. 3, n. 2-3, p. 307-316, 2003.

SHIRAKAWA, H.; IKEDA, S. Cyclotrimerization of acetylene by the tris (acetylacetonato) titanium (III)-diethylaluminum chloride system. **Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition**, v. 12, n. 5, p. 929-937, 1974.

SHIRAKAWA, H.; LOUIS, E. J.; MACDIARMID, A. G.; CHIANG, C. K. Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, (CH)<sub>x</sub>. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 16, p. 578-580, 1977.

SILVA, A. J. C.; NOGUEIRA, F. A. R.; TONHOLO, J.; RIBEIRO, A. S. Dual-type electrochromic device based on polypyrrole and polythiophene derivatives. **Solar Energy Materials and Solar Cells**, v. 95, n. 8, p. 2255-2259, 2011.

SILVA, F. G.; SILVA, S. J. S.; ROCCO, I. M.; SILVEIRA, V. R. Avaliação de kits comerciais para detecção de antígenos NS1-dengue-São Paulo. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista (Online)**, v. 8, n. 91, p. 14-26, 2011.

SILVA, F.; VIEIRA, S.; GOULART, L.; BOODTS, J. Electrochemical investigation of oligonucleotide-DNA hybridization on poly (4-methoxyphenethylamine). **International journal of molecular sciences**, v. 9, n. 7, p. 1173-1187, 2008.

SILVA, M.; DIAS, A.; CORDEIRO, M.; MARQUES JR, E. A thiophene-modified screen printed electrode for detection of dengue virus NS1 protein. **Talanta**, v. 128, p. 505-510, 2014.



SILVA, T. A.; FERREIRA, L. F.; SOUZA, L. M.; GOULART, L. R. New approach to immobilization and specific-sequence detection of nucleic acids based on poly (4-hydroxyphenylacetic acid). **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, n. 2, p. 539-545, 2009.

SKELLEY, D.; BROWN, L.; BESCH, P. Radioimmunoassay. **Clinical chemistry**, v. 19, n. 2, p. 146-186, 1973.

SOLOMON, T.; MALLEWA, M. Dengue and other emerging flaviviruses. **Journal of Infection**, v. 42, n. 2, p. 104-115, 2001.

SOTZING, G. A.; REYNOLDS, J. R.; STEEL, P. J. Electrochromic conducting polymers via electrochemical polymerization of bis (2-(3, 4-ethylenedioxy) thienyl) monomers. **Chemistry of Materials**, v. 8, n. 4, p. 882-889, 1996.

SOUZA, M. D. F. B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Química nova**, v. 20, n. 2, p. 191-195, 1997.

STEPHENSON, J. R. The problem with dengue. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 9, p. 643-646, 2005.

STOICA, T.; TEODORESCU, V.; BLANCHIN, M.; STOICA, T. Morphology, structure and optical properties of sol-gel ITO thin films. **Materials Science and Engineering: B**, v. 101, n. 1-3, p. 222-226, 2003.

STRADIOTTO, N. R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical sensors: a powerful tool in analytical chemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 159-173, 2003.

SU, L.; JIA, W.; HOU, C.; LEI, Y. Microbial biosensors: a review. **Biosensors and bioelectronics**, v. 26, n. 5, p. 1788-1799, 2011.

SUDIRO, T. M.; ISHIKO, H.; GREEN, S.; VAUGHN, D. W. Rapid diagnosis of dengue viremia by reverse transcriptase-polymerase chain reaction using 3'-noncoding region universal primers. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 56, n. 4, p. 424-429, 1997.

SULEIMAN, A. A.; GUILBAULT, G. G. Recent developments in piezoelectric immunosensors. A review. **Analyst**, v. 119, n. 11, p. 2279-2282, 1994.

SURI, C. R.; RAJE, M.; VARSHNEY, G. C. Immunosensors for pesticide analysis: antibody production and sensor development. **Critical reviews in biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 15-32, 2002.

SWALEN, J. D.; ALLARA, D.; ANDRADE, J. D.; CHANDROSS, E. Molecular monolayers and films. A panel report for the materials sciences division of the department of energy. **Langmuir**, v. 3, n. 6, p. 932-950, 1987.

TANG, H.; ZHOU, Z.; ZHONG, Y.; LIAO, H. Electropolymerization of 3-methylthiophene in the presence of a small amount of bithiophene and its usage as hole transport layer in organic light emitting diodes. **Thin Solid Films**, v. 515, n. 4, p. 2447-2451, 2006.

TAOUIL, A. E.; LALLEMAND, F.; HIHN, J.; BLONDEAU-PATISSIER, V. Electrosynthesis and characterization of conducting polypyrrole elaborated under high frequency ultrasound irradiation. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 907-910, 2011.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 867-871, 2002.

TEIXEIRA, M. D. G.; BARRETO, M. L.; GUERRA, Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Informe epidemiológico do SUS**, v. 8, n. 4, p. 5-33, 1999.

TEIXEIRA, M. D. G.; COSTA, M. D. C. N.; BARRETO, M. L.; MOTA, E. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, p. 1307-1315, 2005.

TELES, F.; FONSECA, L. Trends in DNA biosensors. **Talanta**, v. 77, n. 2, p. 606-623, 2008.

TELES, F. S. R. R.; TAVIRA, L. A. P. T.; FONSECA, L. J. P. Biosensors as rapid diagnostic tests for tropical diseases. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 47, n. 3, p. 139-169, 2010.

THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Analytical Letters**, v. 34, n. 5, p. 635-659, 2001.

TICHONIUK, M.; LIGA J, M.; FILIPIAK, M. Application of DNA hybridization biosensor as a screening method for the detection of genetically modified food components. **Sensors**, v. 8, n. 4, p. 2118-2135, 2008.

TIMOFEEV, A.; BUTENKO, V.; STEPHENSON, J. Genetic vaccination of mice with plasmids encoding the NS1 non-structural protein from tick-borne encephalitis virus and dengue 2 virus. **Virus Genes**, v. 28, n. 1, p. 85-97, 2004.

TLILI, C.; KORRI-YO USSOUFI, H.; PONSONNET, L.; MARTELET, C. Electrochemical impedance probing of DNA hybridisation on oligonucleotide-functionalised polypyrrole. **Talanta**, v. 68, n. 1, p. 131-137, 2005.

TOLEDO, A. L. A. D.; ESCOSTEGUY, C. C.; MEDRONHO, R. D. A.; ANDRADE, F. C. D. Reliability of the final dengue diagnosis in the epidemic occurring in Rio de Janeiro, Brazil, 2001-2002. **Cadernos de saude publica**, v. 22, n. 5, p. 933-940, 2006.

TRAN, A.; RAFFY, M. On the dynamics of dengue epidemics from large-scale information. **Theoretical population biology**, v. 69, n. 1, p. 3-12, 2006.

TROJANOWICZ, M.; KRAWCZYNSKI VEL KRAWCZYK, T.; ALEXANDER, P. Organic conducting polymers as active materials in electrochemical chemo-sensors and biosensors. **Chemia analityczna**, v. 42, n. 2, p. 199-213, 1997.

VAN DORST, B.; MEHTA, J.; BEKAERT, K.; ROUAH-MARTIN, E. Recent advances in recognition elements of food and environmental biosensors: a review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 4, p. 1178-1194, 2010.

VAZQUEZ, S.; RUIZ, D.; BARRERO, R.; RAMIREZ, R. Kinetics of dengue virus NS1 protein in dengue 4-confirmed adult patients. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 68, n. 1, p. 46-49, 2010.

VIDAL, J.-C.; GARCIA-RUIZ, E.; CASTILLO, J.-R. Recent advances in electropolymerized conducting polymers in amperometric biosensors. **Microchimica Acta**, v. 143, n. 2-3, p. 93-111, 2003.

VIEIRA, S. N.; FERREIRA, L. F.; FRANCO, D. L.; AFONSO, A. S. Electrochemical Modification of Graphite Electrodes with Poly (4-aminophenol). *Macromolecular Symposia*, 2006. Wiley Online Library. p.236-242.

VO-DINH, T.; CULLUM, B. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. **Fresenius' journal of analytical chemistry**, v. 366, n. 6, p. 540-551, 2000.

VORNDAM, V.; KUNO, G. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. **Dengue and dengue hemorrhagic fever**. **CAB International**, New York, NY, p. 313-333, 1997.

WALLACE, G. G.; TEASDALE, P. R.; SPINKS, G. M.; KANE-MAGUIRE, L. A. Conductive electroactive polymers: intelligent materials systems. **CRC press**, 2002.

WANG, Y.; XU, H.; ZHANG, J.; LI, G. Electrochemical sensors for clinic analysis. **Sensors**, v. 8, n. 4, p. 2043-2081, 2008.

WANG, Y.; YE, Z.; YING, Y. New trends in impedimetric biosensors for the detection of foodborne pathogenic bacteria. **Sensors**, v. 12, n. 3, p. 3449-3471, 2012.

WATKINS, B. F.; BEHLING, J. R.; KARIV, E.; MILLER, L. L. Chiral electrode. **Journal of the American Chemical Society**, v. 97, n. 12, p. 3549-3550, 1975.

WHO. World Health Organization, **Dengue and severe dengue**. 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. Acesso em: 06 jun. 2019.

WHO. World Health Organization. **Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control**. Geneva, 1997. Disponível em: <http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/Denguepublication/en/index.html>. Acesso em: 06 jun. 2019.

WILSON, R.; TURNER, A. Glucose oxidase: an ideal enzyme. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 7, n. 3, p. 165-185, 1992.

WUJCIK, E.; WEI, H.; ZHANG, X.; GUO, J. Antibody nanosensors: a detailed review. **RSC Advances**, v. 4, n. 82, p. 43725-43745, 2014.

XAVIER, A. L. R.; FREITAS, M. S. D.; LOUREIRO, F. M.; BORGHI, D. P. Manifestações clínicas na dengue: diagnóstico laboratorial. **J. bras. med.**, v. 102, n. 2, 2014.

XIE, Y.; JIANG, F.; XU, J.; ZENG, L. Electrosyntheses and characterization of poly (9-bromophenanthrene) in boron trifluoride diethyl etherate. **European Polymer Journal**, v. 45, n. 2, p. 418-425, 2009.

YING-SING, F.; SHI-HUI, S.; DE-RONG, Z. Piezoelectric crystal for sensing bacteria by immobilizing antibodies on divinylsulphone activated poly-m-aminophenol film. **Talanta**, v. 51, n. 1, p. 151-158, 2000.

YOUNG, P. R.; HILDITCH, P. A.; BLECHLY, C.; HALLORAN, W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1053-1057, 2000.

ZAINAH, S.; WAHAB, A. A.; MARIAM, M.; FAUZIAH, M. Performance of a commercial rapid dengue NS1 antigen immunochromatography test with reference to dengue NS1 antigen-capture ELISA. **Journal of virological methods**, v. 155, n. 2, p. 157-160, 2009.

ZENG, F.-W.; LIU, X.-X.; DIAMOND, D.; LAU, K. T. Humidity sensors based on polyaniline nanofibres. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 143, n. 2, p. 530-534, 2010.

ZHANG, X.; JU, H.; WANG, J. Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications. **Academic Press**, 2011.

## **CAPÍTULO 1 - ELETROPOLIMERIZAÇÃO DE DERIVADOS DE FENOL E ANILINA: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO COMO TRANSDUTORES ELETROQUÍMICOS**

*Resultados deste artigo publicados no Journal of Electroanalytical Chemistry 846 (2019) 113163. Electropolymerization of phenol and aniline derivatives: Synthesis, characterization and application as electrochemical transducers (DOI: 10.1016/j.jelechem.2019.05.045)*

### **RESUMO**

Neste trabalho sintetizamos, caracterizamos (eletroquimicamente, morfológicamente e estruturalmente) e propusemos um mecanismo de eletropolimerização para obtenção de filmes poliméricos derivados do ácido 4-aminobenzóico (4-ABA), 4-aminobenzamida (4-ABZ), ácido 4-hidroxibenzóico (4-HBA) e 4-hidroxibenzamida (4-HBZ) para serem utilizados como transdutores eletroquímicos aplicados ao desenvolvimento inicial de um imunossensor para dengue. A eletropolimerização destes monômeros sobre eletrodos de grafite (EG) em solução de ácido sulfúrico 0,5 M foi obtida por voltametria cíclica (VC) e aplicação de 100 ciclos potenciais a 50 mV/s. A caracterização dos filmes poliméricos foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), ressonância magnética nuclear (RMN), voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). Todos os filmes poliméricos obtidos mostraram adsorção na superfície do EG, e mostraram atividade eletroquímica na região potencial de +0,3 a +0,8 V. As imagens de MEV comprovaram a modificação das superfícies dos eletrodos de grafite pelos filmes poliméricos com características morfológicas específicas para cada filme polimérico. As análises por FTIR e RMN mostram a presença de ligação C-O-C para o poli(4-HBA) e poli(4-HBZ), sugerindo que a polimerização começa através do grupo hidroxila fenólico. Da mesma forma, para o poli(4-ABA) e poli(4-ABZ) a polimerização ocorre através do grupo amino ligado ao anel, resultando na ligação C-N-C. Em todos os casos, os grupos carboxila e amida foram preservados nos polímeros. O mecanismo de eletropolimerização e estruturas químicas dos polímeros foram propostos, incluindo a forma oxidada e reduzida dos compostos. Estudos preliminares para a imobilização da rNS1 realizados por adsorção física foram avaliados através dos quatro transdutores estudados, incluindo a análise das amostras de soro humano contendo anticorpos positivos e negativos para Dengue. O poli(4-ABA) e poli(4-HBA) apresentaram

maior sensibilidade no reconhecimento de alvos positivos da doença com um aumento de 65% e 62%, respectivamente, no sinal obtido em relação ao antígeno para ambos os casos.

**Palavras-chave:** eletropolimerização; caracterização; FTIR; RMN; filmes poliméricos; Dengue; biossensor.

## ABSTRACT

In this work we synthesized, characterized (electrochemically, morphologically and structurally) and proposed an electropolymerization mechanism to obtain polymer films derived from 4-aminobenzoic acid (4-ABA), 4-aminobenzamide (4-ABZ), 4-hydroxybenzoic acid (4-HBA) and 4-hydroxybenzamide (4-HBZ) to be used as electrochemical transducers applied to the initial development of an immunosensor for dengue. The electropolymerization of these monomers over graphite electrodes (GE) in 0.5 M sulfuric acid solution was obtained using cyclic voltammetry (CV), and applying 100 potential cycles at 50 mV/s. The characterization of the polymeric films was performed by scanning electron microscopy (SEM), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), nuclear magnetic resonance (NMR), cyclic voltammetry, and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). All the polymer films obtained showed adsorption on the surface of the GE and showed electrochemical activity in the potential region of 0.3 to 0.8 V. SEM images proved the modification of the graphite electrodes surfaces by the polymeric films with specific morphological characteristics for each polymeric film. FTIR and NMR analysis show the presence of C–O–C bond for the poly(4-HBA) and poly(4-HBZ) suggesting that the polymerization begins through the phenolic hydroxyl group. Similarly, for the poly(ABA) and poly(ABZ) the polymerization occur through the amino group attached to the ring, resulting in C–N–C bond. In all cases, the carboxyl and amide groups were preserved in the polymers. The electropolymerization mechanism and chemical structures of the polymers were proposed, including the oxidized and reduced form of the compounds. Preliminary studies for the rNS1 immobilization performed by physical adsorption were evaluated through the four studied transducers, including analysis of the serum human samples containing positive and negative antibodies to Dengue. The poly(4-ABA) and poly(4-HBA) presented greater sensitivity in the recognition of positive targets of the disease with an increase approximate of 65% and 62%, respectively, in the obtained signal with respect to the antigen for both cases.

**Keywords:** electropolymerization; characterization; FTIR; NMR; polymeric films; Dengue; biosensor.





## 1. INTRODUÇÃO

Polímeros condutores têm recebido grande atenção científica devido às suas propriedades particulares e ampla aplicação tecnológica. As propriedades que tornam esses condutores atraentes incluem uma ampla faixa de condutividade elétrica (AWUZIE, 2017), baixa energia de ionização e alta afinidade eletrônica, uma vez que são formados por uma cadeia principal contendo ligações simples e duplas alternadas. Assim, estes materiais exibem um sistema conjugado  $\pi$  estendido com propriedades elétricas, ópticas e magnéticas interessantes (AHUJA, MIR e KUMAR, 2007). Desde sua descoberta em 1977, numerosas aplicações foram relatadas relacionadas a esses polímeros intrinsecamente condutores, especialmente em química analítica, para a fabricação de baterias recarregáveis (SU, WANG, XU *et al.*, 2013), dispositivos eletrocromáticos (MURRAY, EWING e DURST, 1987), diodos emissores de luz (GRANLUND, NYBERG, STOLZ ROMAN *et al.*, 2000), proteção contra corrosão (SAMET, KRAIEM e ABDELHÉDI, 2010) e construção de sensores e biossensores (JANATA e JOSOWICZ, 2003) para monitoramento analítico (DESHPANDE e AMALNERKAR, 1993; OKABAYASHI, GOTO, ABE *et al.*, 1987).

Os eletrodos modificados com filmes poliméricos apresentam boa estabilidade, reprodutibilidade, locais mais ativos, homogeneidade na deposição eletroquímica e forte aderência à superfície do eletrodo (OHNUKI, MATSUDA, OHSAKA *et al.*, 1983; RODRIGUES, FERREIRA, SONODA *et al.*, 2014; SHA, QIAN, MA *et al.*, 2006). Assim, os polímeros podem ser sintetizados por muitas técnicas que incluem polimerização química e eletroquímica (LANGE, ROZNYATOVSKAYA e MIRSKY, 2008; MA, LI, XU *et al.*, 2006). A polimerização eletroquímica é considerada uma rota mais eficaz e versátil (D'ERAMO, ZÓN, FERNÁNDEZ *et al.*, 2008), uma vez que não requer agente oxidante, apresenta cinética rápida e a possibilidade de utilizar um grande número de monômeros. Isto pode ser atribuído à facilidade no controle de potencial com a produção de filmes poliméricos com propriedades interessantes e diferentes (INZELT, PINERI, SCHULTZE *et al.*, 2000). Além disso, a síntese de filmes poliméricos finos pela eletropolimerização de diversos compostos apresenta diversas aplicações em tecnologia avançada (BEREKET e DURAN, 2009).

A eletropolimerização apresenta diversas vantagens relacionadas à produção direta de polímeros no estado dopado e não-dopado (PANG, LI, DING *et al.*, 2007). Esta síntese ocorre pela oxidação anódica do monômero em eletrodos inertes como platina, carbono, ouro e outros (SAYRE e COLLARD, 1995). Tais polímeros podem ser depositados eletroquimicamente em eletrodos metálicos ou semicondutores na forma de filmes. O início

mais aceitável de um mecanismo de eletropolimerização de um monômero aromático é a formação de um cátion radical em duas unidades do monômero (RONCALI, 1992), seguido de uma formação de dímero com a saída de dois prótons e a reconstituição do sistema aromático (WALTMAN e BARGON, 1986). A reação continua com o dímero e outro monômero carregado para formar um trímero e assim sucessivamente até o polímero ser formado. O fator determinante para a obtenção de um polímero com alto grau de conjugação é o equilíbrio em relação à estabilidade do cátion radical do monômero. Um cátion radical muito estável pode se difundir do eletrodo, dando origem a oligômeros solúveis, enquanto um muito reativo pode dar origem a numerosas reações inespecíficas. As propriedades elétricas e físico-químicas do material eletrossintetizado dependem fortemente das condições de síntese, como a concentração do monômero, natureza do meio eletrolítico, temperatura do meio de reação, entre outras (TAN, TAN, KHOR *et al.*, 1991; WAN, 1989).

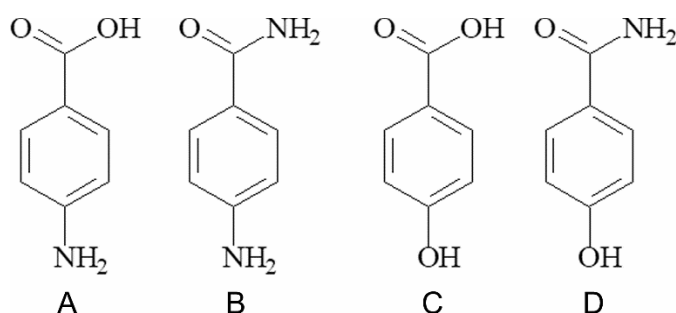
A modificação da superfície dos eletrodos pela deposição de materiais funcionalizados tem recebido considerável atenção nas últimas duas décadas, devido à possibilidade de gerar dispositivos de alta sensibilidade e seletividade para muitas aplicações, incluindo eletrocatalise (GRIESE, KAMPOURIS, KADARA *et al.*, 2008) e biossensores (GERARD, CHAUBEY e MALHOTRA, 2002). Assim, a tecnologia eletroquímica vem se aplicando à produção de eletrodos modificados devido à simplicidade e vantagem de se obter polímeros condutores que possam ser dopados simultaneamente (XIE, JIANG, XU *et al.*, 2009).

Estudos relataram a preparação de filmes poliméricos sobre eletrodos pela eletropolimerização de uma variedade de compostos aromáticos (DESHPANDE e AMALNERKAR, 1993; JANATA e JOSOWICZ, 2003; MURRAY, EWING e DURST, 1987; OHNUKI, MATSUDA, OHSAKA *et al.*, 1983; OKABAYASHI, GOTO, ABE *et al.*, 1987; SAMET, KRAIEM e ABDELHÉDI, 2010). Portanto, alguns estudos anteriores indicam que a eletropolimerização de monômeros contendo grupos aromáticos diretamente ligados ao oxigênio ou nitrogênio são mais fáceis de polimerizar, uma vez que produz filmes eletroativos e condutores (HEINZE, 1990; SYED e DINESAN, 1991), apresenta alta reprodutibilidade e permite maior estabilidade ao eletrodo modificado (LOFRANO, MADURRO, ABRANTES *et al.*, 2004). Polímeros funcionalizados com grupos amino, carboxila ou aldeído podem favorecer a formação de ligações covalentes com biomoléculas, pois estes grupos podem constituir sítios reativos para incorporação de biomoléculas (LI, J. e LIN, 2007), com aplicações em sensores, biossensores eletroquímicos, catalise e outros (GERARD, CHAUBEY e MALHOTRA, 2002).

Neste trabalho, investigou-se a eletropolimerização e caracterização dos materiais derivados do ácido 4-aminobenzóico (4-ABA), 4-aminobenzamida (4-ABZ), ácido 4-

hidroxibenzóico (4-HBA) e 4-hidroxibenzamida (4-HBZ) (Fig. 1). Os polímeros foram avaliados como transdutores para plataformas sensoras para o desenvolvimento de um imunossensor para diagnosticar Dengue através da imobilização da proteína recombinante não estrutural 1 (rNS1) e reconhecimento de anticorpos positivos e negativos da doença obtidos a partir de amostras de soro humano.

**Figura 1:** Estruturas químicas dos monômeros investigados. A) ácido 4-aminobenzóico (4-ABA), B) 4-aminobenzamida (4-ABZ), C) ácido 4-hidroxibenzóico (4-HBA) e D) 4-hidroxibenzamida (4-HBZ).



Atualmente, a dengue é a arbovirose mais comum no mundo, já que o vetor viral - o mosquito *Aedes aegypti* - se espalhou consideravelmente nas últimas décadas devido à mudança climática global e a outros fatores. Além disso, a Dengue é endêmica em quase todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo, o que significa que cerca de 40% da população mundial está em risco de contrair uma infecção por Dengue (BHATT, GETHING, BRADY *et al.*, 2013). Consequentemente, a cada ano, o número de novos casos de Dengue aumenta, especialmente em regiões tropicais como o Brasil. Atualmente, uma variedade de métodos de detecção está disponível para o diagnóstico da Dengue, mas às vezes estes métodos são imprecisos, já que os primeiros sintomas da Dengue podem ser confundidos com os de outras doenças, e assim o diagnóstico precoce da doença se torna difícil quando baseado apenas em aspectos clínicos.

Portanto, os filmes poliméricos podem facilitar o processo de imobilização da rNS1, uma vez que os grupos funcionais dos monômeros permanecem mesmo após a eletropolimerização. Estes grupos podem interagir com os grupos funcionais de biomoléculas, garantindo excelente eficiência na imobilização e melhor sensibilidade. Os monômeros 4-ABA e 4-HBA já foram estudados (FERREIRA, SANTOS, DA CRUZ *et al.*, 2015; FERREIRA, SOUZA, FRANCO *et al.*, 2011), mas não ao lado dos monômeros 4-ABZ e 4-HBZ, especialmente para aplicação em biossensores para o diagnóstico da Dengue.



## 2. METODOLOGIA

### 2.1 – Reagentes

Bastão de grafite (99,9995%) e 4-ABA (99%) foram adquiridos da Alfa Aesar (Ward Hill, EUA). 4-ABZ (98%), 4-HBA ( $\geq 99\%$ ), 4-HBZ (98%), hexacianoferrato de potássio (II) tri-hidratado ( $\geq 99,5\%$ ), ferricianeto de potássio (III) ( $\geq 99\%$ ), cloreto de hexaaminrutênio (II) (99,9%), cloreto de hexaaminrutênio (III) (98%), ácido sulfúrico (reagente ACS), cloreto de potássio ( $\geq 99,0\%$ ), ácido etilenodiaminotetracético - EDTA ( $\geq 99\%$ ), cloreto de sódio ( $\geq 99,5\%$ ), Hepes ( $\geq 99,5\%$ ) e acetonitrila (reagente ACS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Estes reagentes foram utilizados como recebidos e sem etapas de purificação, preparados em água deionizada (18,2 M $\Omega$ .cm), obtida pelo sistema PURELAB Classic DI (Elga). Todas as soluções foram preparadas recentemente e desoxigenadas com N<sub>2(g)</sub> durante 10 min antes da utilização.

A solução tampão HBS-EP a pH 7,40 foi utilizada para a dissolução das amostras biológicas e pré-condicionamento dos transdutores. Esta solução foi preparada misturando Hepes 10 mM (pH 7,40), EDTA 3,0 mM (pH 8,0) e NaCl 150 mM.

A rNS1 foi produzida por indução com isopropil-D-1thiogalactopyranoside (IPTG) em rosetta de Escherichia coli BL21, transformada com plasmídeo Pet-28a (+) contendo sequência NS1 (Dengue 2, linhagem Maynnar MM-2, Número de Acesso Genbank: U51929) e purificada por Cromatografia de Afinidade de Coluna de Níquel Imobilizado - IMAC (proteína contendo etiqueta de poli-histidina).

Soros sanguíneos foram obtidos de pacientes diagnosticados com vírus da Dengue e pacientes saudáveis (Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG - Brasil - banco de amostras - Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Dengue e Microrganismo Hospedeiro de Interação).

### 2.2 – Equipamentos

Para todas as medidas eletroquímicas foi utilizado um Potenciostato/Galvanostato da Autolab®, modelo PGSTAT 128N, acoplado a um computador com módulo FRA32M e software Nova 1.11. Os experimentos foram realizados utilizando uma célula eletroquímica com capacidade de 100 mL, com exceção dos experimentos de detecção de biomoléculas, que foram realizados em uma célula eletroquímica com capacidade de 1,0 mL.

Em todos os casos, discos de grafite com área geométrica de 29,7 mm<sup>2</sup> foram utilizados como eletrodos de trabalho, enquanto fio de platina (32,2 mm<sup>2</sup>) foi utilizado como eletrodo auxiliar e Ag/AgCl (3,0 M KCl) como eletrodo de referência.

### 2.3 – Eletropolimerização

Antes da etapa de formação dos filmes poliméricos, os eletrodos de grafite (EG) foram analisados por voltametria cíclica (VC) por meio da solução de ácido sulfúrico 0,50 M e também em solução aquosa de ferrocianeto/ferricianeto de potássio 5,0 mM contendo 0,1 M de KCl. Nestas etapas, cinco ciclos de potencial consecutivos foram realizados na presença de ácido sulfúrico 0,5 M na faixa de potencial de 0,0 a +1,2 V para o 4-ABA, +0,0 a +1,3 V para a 4-ABZ e 4-HBZ, e +0,0 a +1,4 V para o 4-HBA, e três ciclos de potencial consecutivos na presença de K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], numa faixa de potencial de -0,25 a +0,80 V.

A eletropolimerização foi realizada por VC. Os EG foram modificados com 100 ciclos de potencial consecutivos de 0,0 a +1,2 V para o 4-ABA, +0,0 a +1,3 V para a 4-ABZ, 4-HBZ e +0,0 a +1,4 V para o 4-HBA, em monômero 2,5 mM preparado em solução aquosa de ácido sulfúrico 0,5 M. Em todos os casos, a velocidade de varredura utilizada foi de 50 mV/s.

A análise dos filmes poliméricos formados na superfície do EG foi realizada através de estudos eletroquímicos, morfológicos e espectroscópicos, visando caracterizar e investigar as propriedades dos materiais obtidos.

### 2.4 – Caracterização morfológica

A morfologia do EG e do EG modificado foi analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), na qual as amostras foram submetidas à uma ampliação de 50.000x, utilizando um microscópio de mesa modelo TM-3000 da Hitachi. As imagens foram obtidas a 30 kV usando os elétrons retroespalhados detectados no modo composto.

### 2.5 – Caracterização estrutural

Para caracterização dos produtos obtidos após cada eletropolimerização, o processo foi semelhante ao descrito na Seção 2.3. No entanto, foram utilizados 200 ciclos de potencial sobre eletrodos de cilindro de grafite (30 x 0,6 mm) com área geométrica de aproximadamente 6,1 cm<sup>2</sup>. Como eletrodos de referência e auxiliar, utilizou-se Ag/AgCl (3,0 M KCl) e eletrodo

de grafite cilíndrico ( $9,9 \text{ cm}^2$ ), respectivamente. Após a eletropolimerização, os eletrodos foram lavados com água deionizada e secos sob  $\text{N}_{2(g)}$  ultrapuro. Em seguida, os eletrodos modificados foram imersos em 50 mL de acetonitrila e colocados no ultrassom por 1 h. Após este período, a extração do polímero foi conduzida a partir desta solução por um evaporador rotativo da Fisatom 801. A evaporação do solvente foi realizada à uma temperatura controlada de  $60^\circ\text{C}$  durante 30 min a 80 rpm. O material sólido coletado foi colocado em estufa a  $50^\circ\text{C}$  durante cerca de 24 h para secagem completa. Posteriormente, este material foi então utilizado para análises de caracterização.

Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR): Monômeros e polímeros. Os espectros de FTIR foram obtidos em pastilhas prensadas com KBr usando um espectrômetro da Varian modelo 640-IR equipado com acessório de refletância total atenuada (ATR, Pike Technologies, modelo GladiATR). Os espectros foram registrados na faixa de 4000 a  $400 \text{ cm}^{-1}$ , resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$  e 32 varreduras.

Ressonância magnética nuclear (RMN): A caracterização estrutural também foi realizada utilizando um espectrômetro Bruker FOURRIER 300 (Bruker Biospin, Faellanden, Suíça) operando a 300,18 MHz para  $^1\text{H}$  no Laboratório de Ressonância Nuclear Magnética da UFVJM, Diamantina. As amostras de monômeros e polímeros foram dissolvidas em uma mistura de  $\text{D}_2\text{O}$ /Acetona- $d_6$  (50/50, v/v) contendo tetrametil-silapentano  $5,0 \mu\text{M}$  (TMS como referência interna) a uma concentração de 10 mM. Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  unidimensionais (1D) para todos os experimentos foram registrados utilizando uma sonda de 5 mm de  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  a  $25^\circ\text{C}$ . Todos os experimentos foram obtidos e processados utilizando o software Topspin 3.1 desenvolvido pela Bruker BioSpin. O sinal de ressonância de  $^1\text{H}$  residual de água nas amostras foi suprimido empregando-se a sequência de pulso de pré-saturação zcprr. A largura espectral foi de 6103,52 Hz, números de scans de 128, número de dummy scans 2 e número de pontos no domínio do tempo de 65536 para todas as amostras.

## 2.6 – Caracterização eletroquímica

Os VCs foram obtidos para o EG e EGs modificados em solução do par redox ferrocianeto/ferricianeto de potássio 5,0 mM contendo KCl 0,1 M, na faixa de potencial de  $-0,25$  a  $+0,80 \text{ V}$  e também em solução de cloreto de hexaminrutênio 5,0 mM contendo KCl 0,1 M, na faixa de potencial de  $-0,5$  a  $+0,3 \text{ V}$ . Experimentos em branco foram realizados usando apenas a solução eletrolítica de suporte (KCl 0,1 M), na ausência dos pares redox.

As medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram realizadas em solução aquosa de  $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$  5,0 mM contendo KCl 0,1 M em potencial de circuito aberto (OCP). A faixa de frequência investigada foi de 100 kHz a 10 mHz, com amplitude de excitação senoidal de 10 mV, para investigar e analisar as propriedades elétricas dos eletrodos. A análise dos espectros de impedância foi feita por ajuste dos resultados experimentais para um circuito equivalente usando o software Nova 1.11.

## 2.7 – Imunossensor impedimétrico

Antes da etapa de imobilização, os eletrodos modificados foram pré-condicionados para estabelecer um pré-equilíbrio de pH entre o filme polimérico e a solução tampão. Desta forma, uma linha base de cada eletrodo foi realizada em uma solução tampão de pH 7,4 HBS-EP até sua estabilização. A voltametria de pulso diferencial (VPD) foi utilizada neste estudo, e 10 VPDs foram registrados na mesma faixa de potencial utilizada na eletropolimerização de cada monômero. Os parâmetros de VPD utilizados foram: amplitude de 25 mV, período do pulso de 0,20 s e velocidade de varredura de 20 mV/s. Após o pré-condicionamento, os transdutores foram secos sob  $N_{2(g)}$  e os estudos de otimização do processo de imobilização do antígeno rNS1 e a interação com soros de pacientes saudáveis e de pacientes diagnosticados com dengue foram realizados (Tabela 1). A imobilização do antígeno rNS1 foi realizada por adsorção física diretamente na superfície do eletrodo modificado.

Medidas de EIE foram usadas para monitorar a reação antígeno-anticorpo na superfície do imunossensor. Desta forma, avaliou-se a sensibilidade e o desempenho do biossensor para o reconhecimento de alvos positivos e negativos para a dengue. As condições das medidas são as mesmas usadas na Seção 2.6.

**Tabela 1:** Parâmetros investigados para a construção do imunossensor.

Parâmetros	Variações testadas
Concentração da rNS1 / $\mu\text{g/mL}$	0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 10; 25; 100; 1000; 6000
Diluição dos soros	1:10; 1:60; 1:250; 1:320; 1:1280
Solução da rNS1 / $\mu\text{L}$	15; 20; 30
Solução dos soros / $\mu\text{L}$	15; 20; 30
Temperatura de imobilização / $^{\circ}\text{C}$	25; 37; 42

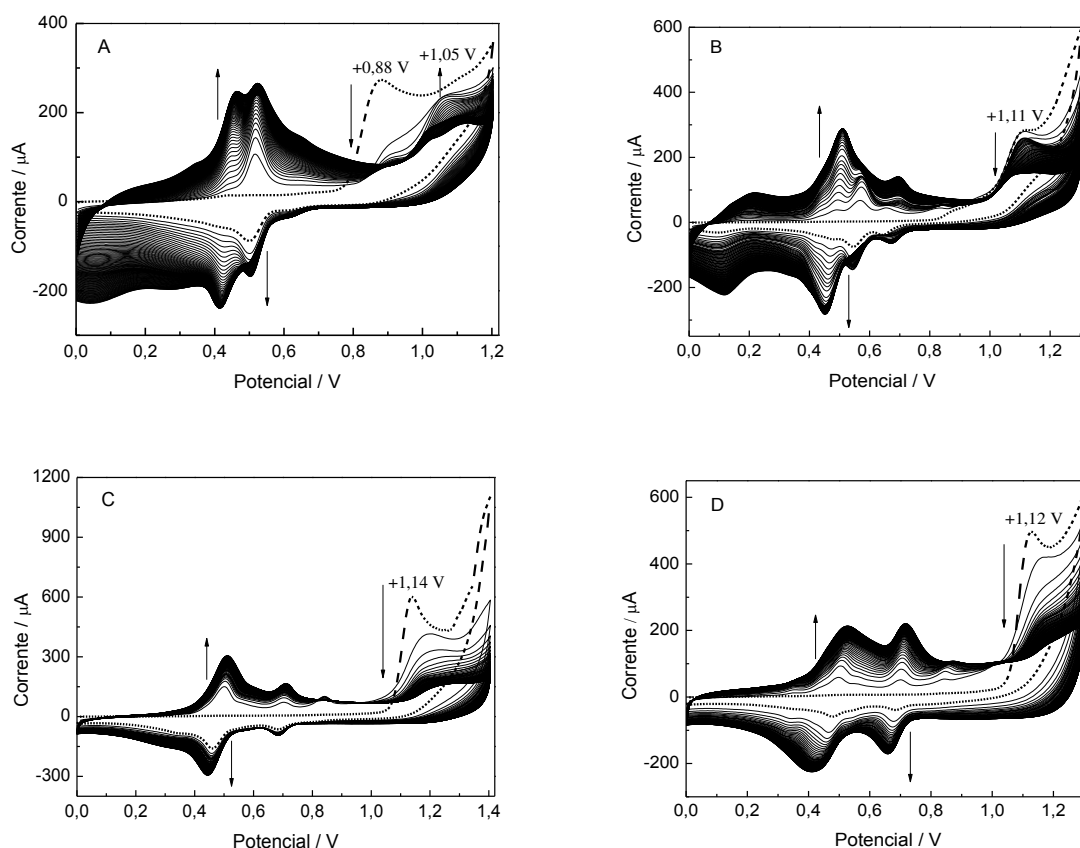


### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 - Caracterização eletroquímica de transdutores baseados em filmes poliméricos

A superfície de grafite tem sido amplamente utilizada por nosso grupo de pesquisa para a eletrodeposição de filmes poliméricos derivados de monômeros funcionalizados para aplicação em biossensores (CORRÊA, DA CRUZ, SANTOS *et al.*, 2018; DA CRUZ, SOUZA, FRANCO *et al.*, 2017; ALVES, SILVA, FERREIRA *et al.*, 2017; ALVES, CORRÊA, DA CRUZ *et al.*, 2018; FERREIRA, SANTOS, DA CRUZ *et al.*, 2015; FERREIRA, SOUZA, FRANCO *et al.*, 2011; PIMENTA, SANTOS, THOMASINI *et al.*, 2018). Tais superfícies garantem a adsorção de filmes mais espessos quando comparados a outros substratos como ouro, por exemplo, provavelmente devido à maior interação química do grafite com o polímero, o que resulta em melhor aderência ao suporte.

**Figura 2:** VCs registrados em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 M contendo 2,5 mM de solução de (A) 4-ABA, (B) 4-ABZ, (C) 4-HBA e (D) 4-HBZ sobre EG. Número de ciclos = 100;  $\nu = 50$  mV/s. (---) 1º ciclo de potencial. As setas indicam a direção da corrente.



Assim, considerando os estudos realizados por Ferreira e colaboradores (2015, 2011) para a eletrogeração do poli(4-HBA) e poli(4-ABA) (FERREIRA, SANTOS, DA CRUZ *et al.*, 2015; FERREIRA, SOUZA, FRANCO *et al.*, 2011), a eletropolimerização do poli(4-ABZ) e poli(4-HBZ) foi realizada sob as mesmas condições, e os VCs resultantes do procedimento são mostrados na Figura 2.

Os monômeros escolhidos são muito semelhantes entre si, pois possuem grupos funcionais oxidáveis ( $-\text{NH}_2$  e  $-\text{OH}$ ) (Fig. 1). A oxidação eletroquímica e a formação de cátions radicais do 4-ABA e 4-ABZ ocorrem através dos grupos amino, enquanto para o 4-HBA e 4-HBZ ocorrem através dos grupos hidroxila.

As Figuras 2A e 2C mostram no primeiro ciclo que o 4-ABA e 4-HBA oxidam irreversivelmente ( $E_{\text{pa}} = +0,88 \text{ V}$  e  $+1,14 \text{ V}$ , respectivamente) sem processos catódicos correspondentes na varredura reversa. As Figuras 2B e 2D mostram que a 4-ABZ e 4-HBZ oxidam irreversivelmente em  $+1,11 \text{ V}$  e  $+1,12 \text{ V}$ , respectivamente, estes picos são atribuídos à oxidação do grupo amino presente na 4-ABZ e do grupo hidroxila presente na 4-HBZ. No entanto, para o poli(4-ABA), foi observado que após o segundo ciclo de potencial o pico de oxidação do monômero é suprimido e um segundo pico aparece em  $+1,05 \text{ V}$ .

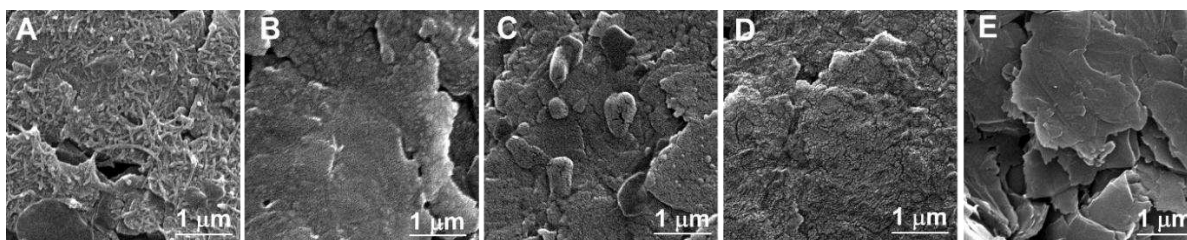
Observa-se para todos os monômeros que, durante os ciclos de potenciais subsequentes, a corrente de pico de oxidação irreversível diminui, indicando o consumo do monômero. Após o primeiro ciclo, um par redox que inclui o intervalo de potencial  $+0,3$  e  $+0,7 \text{ V}$  para o poli(4-ABA),  $+0,3$  e  $+0,8 \text{ V}$  para o poli(4-ABZ),  $+0,3$  e  $+0,9 \text{ V}$  para o poli(4-HBA) e  $+0,2$  e  $+0,9 \text{ V}$  para o poli(4-HBZ) aparecem. Isto é relativo a um material que se forma sobre o eletrodo. Consequentemente, aumentando o número de varreduras de potencial, há um aumento na quantidade de polímero depositado na superfície do eletrodo.

### 3.2 – Análises de MEV

Para analisar a morfologia do EG e dos eletrodos modificados com filmes poliméricos, a análise de MEV foi realizada aplicando-se uma ampliação de 50.000x e os resultados são apresentados na Figura 3.

Através da análise de MEV, é possível observar as diferenças entre os eletrodos não modificados e modificados. A Figura 3E mostra as imagens obtidas por MEV para o EG com uma superfície muito porosa e sem material depositado como já era previsto para um eletrodo não modificado.

**Figura 3:** Imagens de MEV em ampliação de 50.000x para (A) poli(4-ABA), (B) poli(4-ABZ), (C); poli(4-HBA); (D) poli(4-HBZ) e (E) EG.



Comparando a imagem do EG (Fig. 3E) com as imagens do EG modificado (Fig. 3A-D), pode-se ver que a superfície dos eletrodos foi modificada e uma morfologia diferente é observada para o material depositado para cada sistema. O poli(4-ABA) mostra uma morfologia fibrosa, enquanto os outros uma morfologia polimérica mais compactada. Para o poli(4-HBA) e a poli(4-HBZ), pequenas estruturas distribuídas aleatoriamente na superfície do eletrodo são observadas.

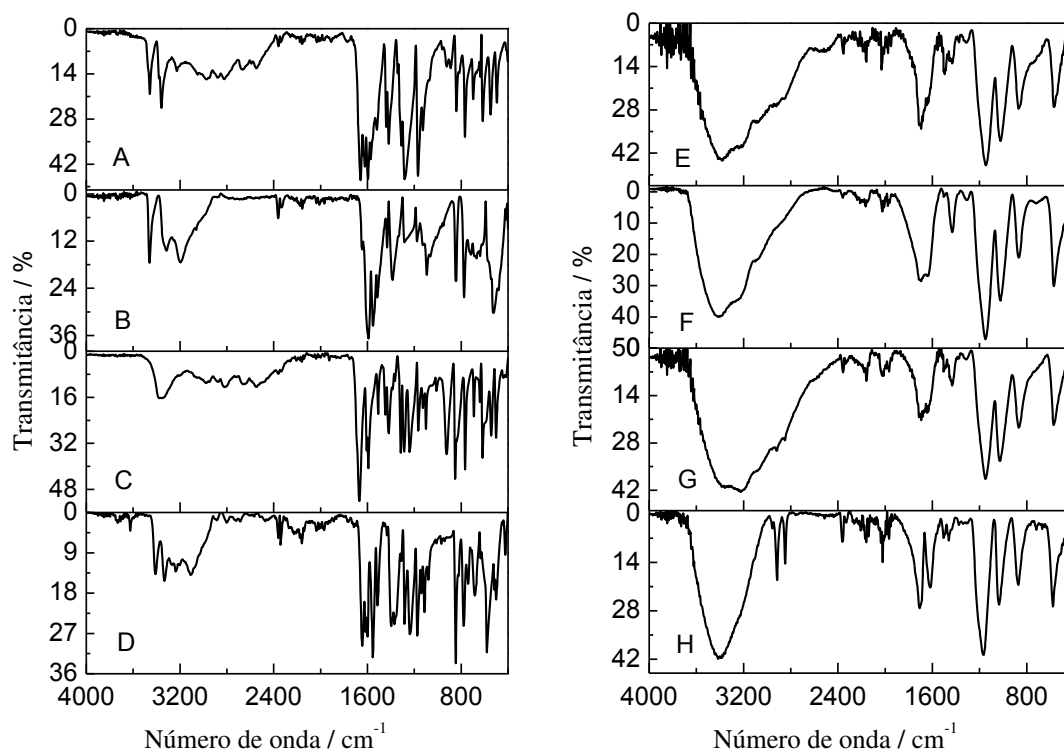
### 3.3 – Caracterização da plataforma por FTIR e RMN de $^1\text{H}$

Os espectros de FTIR dos monômeros e seus filmes poliméricos foram obtidos para confirmar a funcionalização do polímero, como mostrado na Figura 4.

Os espectros de FTIR dos monômeros e polímeros são completamente diferentes um do outro, indicando a polimerização monomérica. Por outro lado, estes quatro monômeros analisados têm em comum os grupos  $-\text{OH}$  e  $-\text{NH}_2$  e são todos aromáticos com 1,4-dissubstituídos.

Em geral, na região entre  $1700$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ , pode-se observar um conjunto de absorções complexas relacionadas aos principais grupos funcionais dos monômeros. O alongamento  $\text{C}=\text{O}$  aparece como uma banda forte na região entre  $1690$  e  $1650\text{ cm}^{-1}$ . A banda forte em torno de  $1240\text{ cm}^{-1}$  está relacionada ao estiramento de  $\text{C}-\text{O}$  de ácidos carboxílicos, e a banda estreita entre  $1600$  e  $1450\text{ cm}^{-1}$  está relacionada ao  $\text{C}=\text{C}$  que se estende a partir de compostos aromáticos. Devido à natureza aromática dos monômeros, há uma contribuição das bandas de absorção em torno de  $3030\text{ cm}^{-1}$  relacionadas ao estiramento  $\text{C}-\text{H}$ . A região entre  $900$  a  $690\text{ cm}^{-1}$  mostra um conjunto de bandas de média intensidade relacionadas à deformação  $\text{C}-\text{H}$  de um anel aromático, principalmente relacionado ao caráter aromático dos monômeros.

**Figura 4:** Espectros de FTIR para os monômeros: (A) 4-ABA, (B) 4-ABZ, (C) 4-HBA, (D) 4-HBZ e seus respectivos polímeros: (E) poli(4-ABA), (F) poli(4-ABZ), (G) poli(4-HBA) e (H) poli(4-HBZ).



Para o 4-HBA e 4-HBZ, pode-se observar a deformação de OH- entre 3600 a 2500  $\text{cm}^{-1}$  devido à presença de hidroxila fenólica, caracterizada por uma banda fraca em 3400  $\text{cm}^{-1}$ . É importante notar que a região entre 1300 a 1020  $\text{cm}^{-1}$  apresenta um conjunto de bandas relacionadas ao estiramento de C-O e, neste caso, relacionadas à estrutura de ambos os ácidos carboxílicos e fenólicos (a partir de 4-HBA).

Após a eletropolimerização, pode-se observar um conjunto de bandas médias na região de estiramento do OH- entre 4000 e 2000  $\text{cm}^{-1}$  para o poli(4-HBA) e poli(4-HBZ). Uma banda de 1170 a 1050  $\text{cm}^{-1}$ , ausente nos espectros dos monômeros, aparece nos espectros dos polímeros, em relação à deformação axial assimétrica de C-O-C, característica de éteres difenílicos. Existe também uma banda larga e intensa correspondente à deformação axial de OH- (SU, WANG, XU *et al.*, 2013) na região entre 3600 e 2500  $\text{cm}^{-1}$ , resultante da associação polimérica, caracterizada na região entre 3400 e 3200  $\text{cm}^{-1}$ , sugerindo que o processo de polimerização envolve os grupos hidroxila na formação das ligações.

Deformações axiais de C=C de anéis aromáticos entre 1450 e 1420  $\text{cm}^{-1}$  podem ser vistas em todos os espectros, indicando que a aromaticidade nos polímeros é preservada.

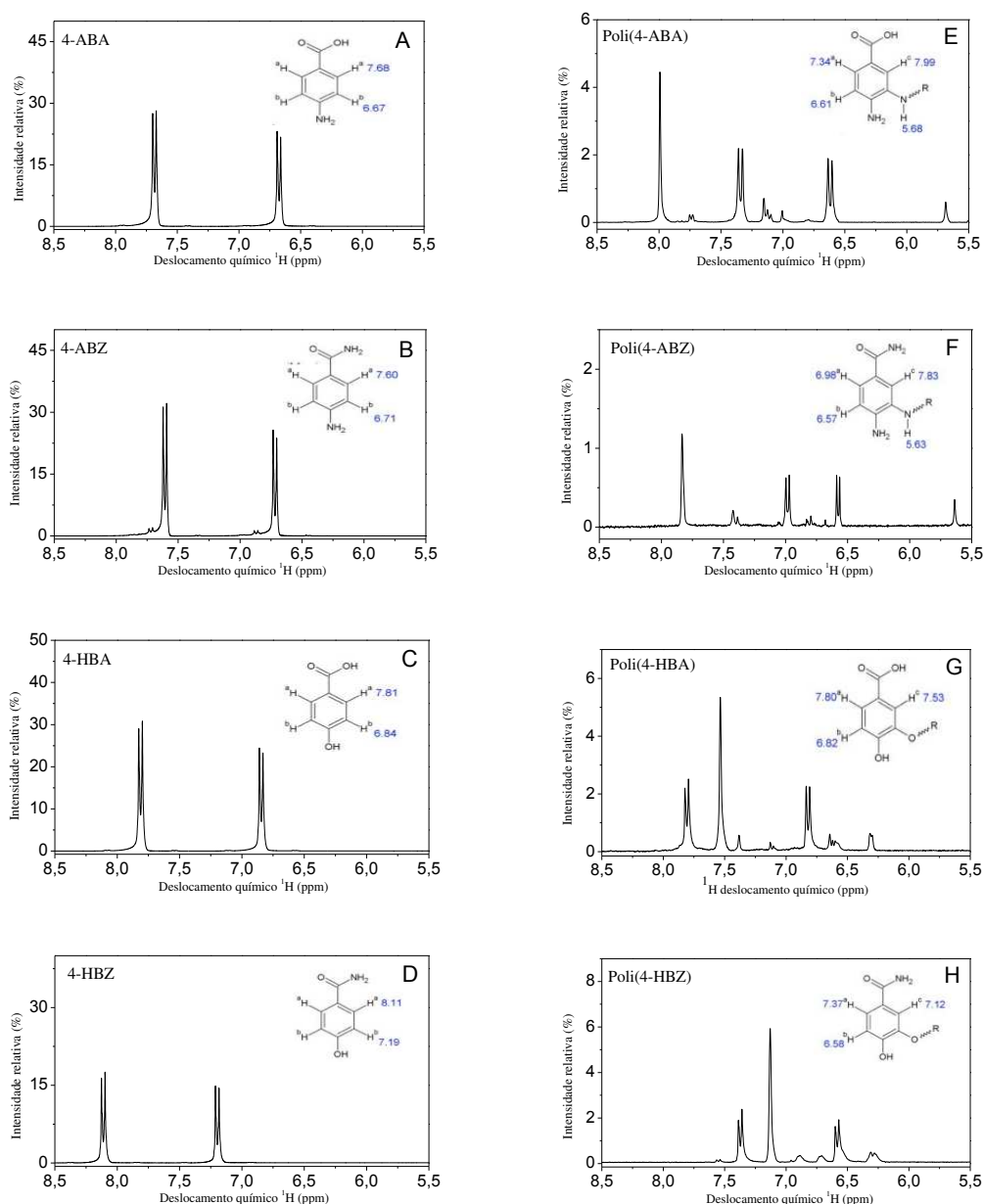
Pode-se observar nas Figuras 4A e 4B o estiramento de N–H na região entre 3500 e 3100  $\text{cm}^{-1}$  para o 4-ABA e 4-ABZ, que é confirmado pelas absorções relacionadas às deformações angulares de N–H na região entre 1640 e 1540  $\text{cm}^{-1}$ , caracterizada por bandas intensas de aminas (presentes no 4-ABA e 4-ABZ) e amidas primárias (presentes na 4-ABZ e 4-HBZ). Na região entre 1050 e 1300  $\text{cm}^{-1}$ , existem bandas estreitas e intensas relacionadas à ligação C–N (MURRAY, EWING e DURST, 1987).

Após o processo de eletropolimerização, observa-se para o poli(4-ABA) e poli(4-ABZ) que a banda larga e pouco intensa na região entre 3500 a 3100  $\text{cm}^{-1}$  no espectro dos monômeros é alterada no espectro dos polímeros, correspondendo à deformação de N–H. Isto ocorre porque a amina ao participar da eletropolimerização é convertida em uma amina secundária. A análise da banda em 1150-870  $\text{cm}^{-1}$ , que aparece apenas no espectro dos polímeros, confirma isso. Esta banda está relacionada com a deformação axial assimétrica da ligação C–N–C característica de aminas secundárias. Este fato indica que o processo de polimerização ocorre preferencialmente pelos grupos amino.

Analizando apenas o 4-ABA (Fig. 4A), observa-se que o estiramento de N–H em 3461 e em 3357  $\text{cm}^{-1}$ , relativa à presença de amina primária, desaparece no espectro do poli(4-ABA), o que reforça a sugestão do mecanismo de eletropolimerização iniciar a partir do átomo de nitrogênio, semelhante ao 2-aminofenol (MU, 2004; SALAVAGIONE, ARIAS, GARCÉS *et al.*, 2004), 3-aminofenol (FRANCO, AFONSO, VIEIRA *et al.*, 2008) e 4-aminofenol (FERREIRA, BOODTS, BRITO-MADURRO *et al.*, 2008). Estes trabalhos sugerem que a polimerização do aminofenol começa através do átomo de nitrogênio.

Notavelmente, um perfil semelhante composto de três bandas intensas pode ser observado entre 1600 e 800  $\text{cm}^{-1}$  para todos os polímeros, indicando um anel aromático trissubstituído 1, 3 e 4, isto é comprovado pelos harmônicos observados nesta região. No entanto, estudos de ressonância magnética nuclear estrutural foram realizados para comprovar as reações de polimerização regiosseletivas e os resultados são mostrados na Figura 5.

**Figura 5:** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  para os monômeros: (A) 4-ABA, (B) 4-ABZ, (C) 4-HBA, (D) 4-HBZ e seus respectivos polímeros: (E) poli(4-ABA), (F) poli(4-ABZ), (G) poli(4-HBA) e (H) poli(4-HBZ).

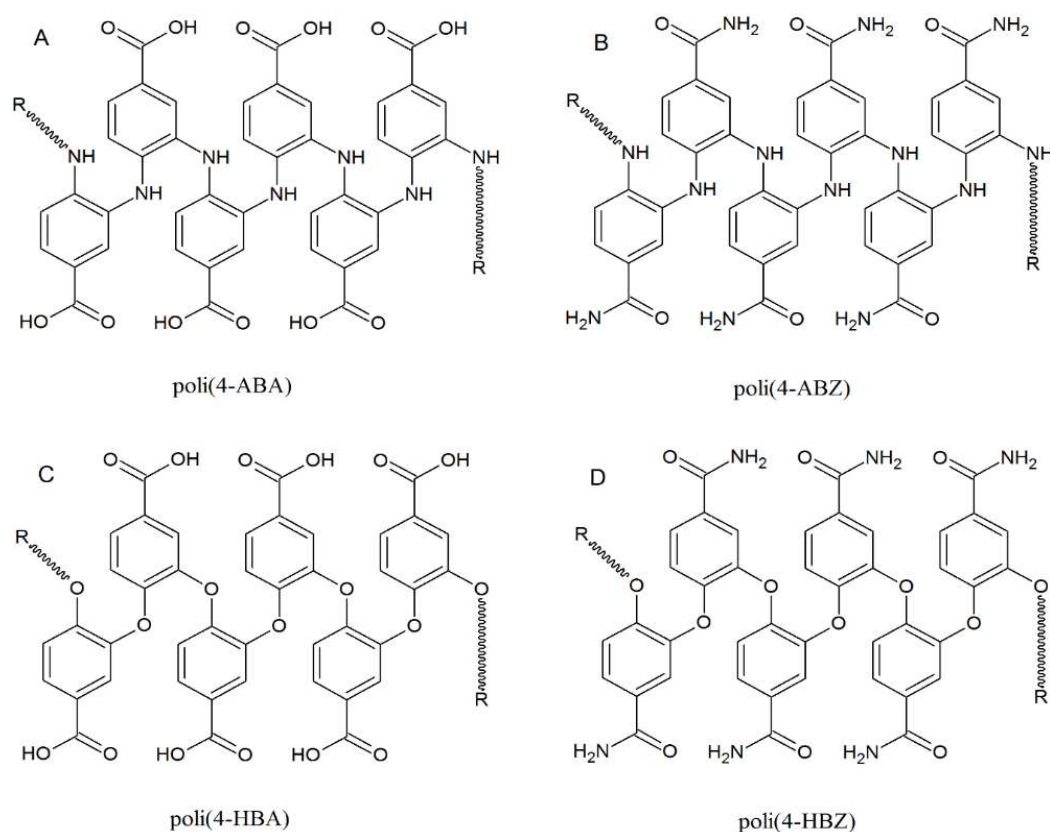


Como esperado, os espectros de RMN  $^1\text{H}$  de todos os monômeros (Fig. 5A-D) revelam dois dupletos devido ao acoplamento escalar ( $^3J$ ) entre os hidrogênios aromáticos *orto* ( $^a\text{H}$ ) e *meta* ( $^b\text{H}$ ) equivalentes em relação aos grupos substituintes carbonilados (WISHART, KNOX, GUO *et al.*, 2008). Claramente, ambientes químicos similares são experimentados por estes hidrogênios aromáticos, resultando em maiores deslocamentos químicos para os  $^a\text{H}$  e menores para os  $^b\text{H}$ . No entanto, mudanças consideráveis podem ser observadas nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  das formas poliméricas. Para o poli(4-ABA) e poli(4-ABZ) (Fig. 5E e F,

respectivamente), foram observadas alterações significativas nos deslocamentos químicos para  $^a\text{H}$  e  $^b\text{H}$  quando comparadas às formas monoméricas. Curiosamente, sinais de ressonâncias de  $^1\text{H}$  intenso (singletos) foram observados em 7,99 ppm no espectro do poli(4-ABA) e 7,83 ppm no espectro do poli(4-ABZ). Estes resultados são consistentes com a presença de hidrogênios aromáticos não equivalentes (posição 2) como consequência da substituição aromática eletrofílica regioseletiva dirigida pelo grupo amino (posição 4). Além disso, a presença de outras ressonâncias  $^1\text{H}$  (singletos) para o poli(4-ABA) (5,68 ppm) e poli(4-ABZ) (5,63 ppm) foi atribuída aos hidrogênios da amina secundária, que promovem a ligação covalente entre as unidades do monômero.

Em relação ao poli(4-HBA) (Fig. 5G) e poli(4-HBZ) (Fig. 5H), deslocamentos químicos inequívocos do  $^1\text{H}$  a 7,53 e 7,12 ppm, respectivamente, foram também atribuídos ao  $^c\text{H}$  não equivalente. No entanto, a presença do grupo hidroxila na posição 4 altera estas ressonâncias para deslocamentos químicos menores em relação ao  $^a\text{H}$ . Com base na caracterização estrutural de FTIR e RMN, as estruturas poliméricas propostas são mostradas na Figura 6.

**Figura 6:** Produtos propostos obtidos a partir da eletropolimerização de (A) poli(4-ABA), (B) poli(4-ABZ), (C) poli(4-HBA) e (D) poli(4-HBZ).



### 3.4 – Mecanismo proposto de eletropolimerização

O monômero aminofenol possui estrutura semelhante aos monômeros estudados neste trabalho, uma vez que possuem o grupo amino ou hidroxila comuns ao aminofenol. Sabe-se da complexidade do processo de oxidação deste monômero devido à presença de dois grupos suscetíveis,  $-\text{OH}$  e  $-\text{NH}_2$ . Alguns mecanismos dos isômeros do aminofenol já foram relatados na literatura. Salavagione e colaboradores (2004) mostraram que a polimerização do 3-aminofenol no ácido perclórico ocorre através do grupo  $-\text{OH}$  enquanto que o 2-aminofenol ocorre através do grupo  $-\text{NH}_2$  (SALAVAGIONE, ARIAS, GARCÉS *et al.*, 2004). De acordo com Bereket e Duran (2009), a presença de grupos C-O-C e  $-\text{NH}_2$  no espectro de FTIR mostra que a polimerização do 3-aminofenol no cobre também ocorre através do grupo  $-\text{OH}$  em meio ácido. A adição sucessiva de cátions radicais ao 3-aminofenol produzirá um poliéter (BEREKET e DURAN, 2009).

O mecanismo proposto para a eletropolimerização do poli(4-ABA), poli(4-ABZ), poli(4-HBA) e poli(4-HBZ) é mostrado na Figura 7.

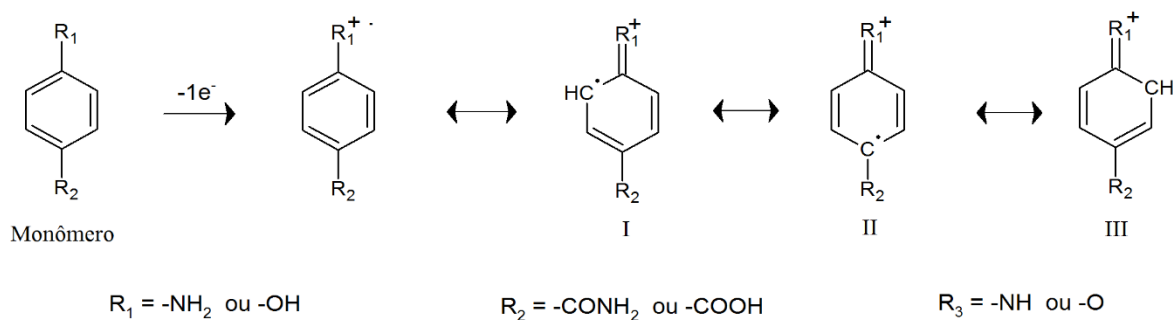
A eletropolimerização começa com a aplicação de um potencial que causa a oxidação eletroquímica do monômero para criar os cátions radicais. O átomo de nitrogênio é protonado no início da reação, uma vez que o monômero foi preparado em solução de ácido sulfúrico com pH próximo de zero. Portanto, na etapa I, ocorre a perda de um próton e a oxidação eletroquímica do monômero, com a perda de um elétron, forma-se um cátion radical que é estabilizado por suas respectivas estruturas de ressonância. As estruturas de ressonância mostram as possibilidades do elétron desemparelhado estar sobre os carbonos aromáticos das posições 1, 3 ou 5 (RODRIGUES, FERREIRA, SONODA *et al.*, 2014). No entanto, a possibilidade da posição C1 estar relacionada ao crescimento da cadeia é descartada, uma vez que esta não pode ser sítio reativo devido ao impedimento estérico causado pelo grupo carboxila ou amida presentes nos monômeros. As demais possibilidades de emparelhamento são por C3 (estrutura III - Etapa 1) ou C5 (estrutura I - Etapa 1).

Benyoucef e colaboradores (2008) propuseram em seu mecanismo para o ácido 2-aminobenzóico, o acoplamento entre moléculas neutras e cátions radicais para a eletrossíntese do poli(2-aminobenzóico) (BENYOUCEF, HUERTA, FERRAHI *et al.*, 2008). Enquanto Rodrigues e colaboradores (2014) realizaram alguns estudos cujos resultados teóricos e experimentais indicaram que o acoplamento deveria ocorrer preferencialmente entre cátions radicais estabilizados por ressonância e seus elétrons não emparelhados (RODRIGUES, FERREIRA, SONODA *et al.*, 2014).



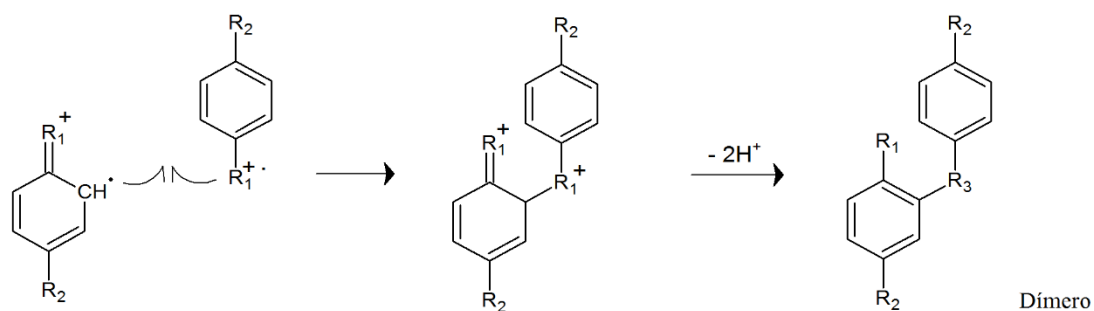
**Figura 7:** Mecanismo genérico proposto para eletropolimerização do 4-ABA, 4-ABZ, 4-HBA e 4-HBZ.

Etapa 1: Oxidação eletroquímica do monômero e estruturas de ressonância para o cátion radical

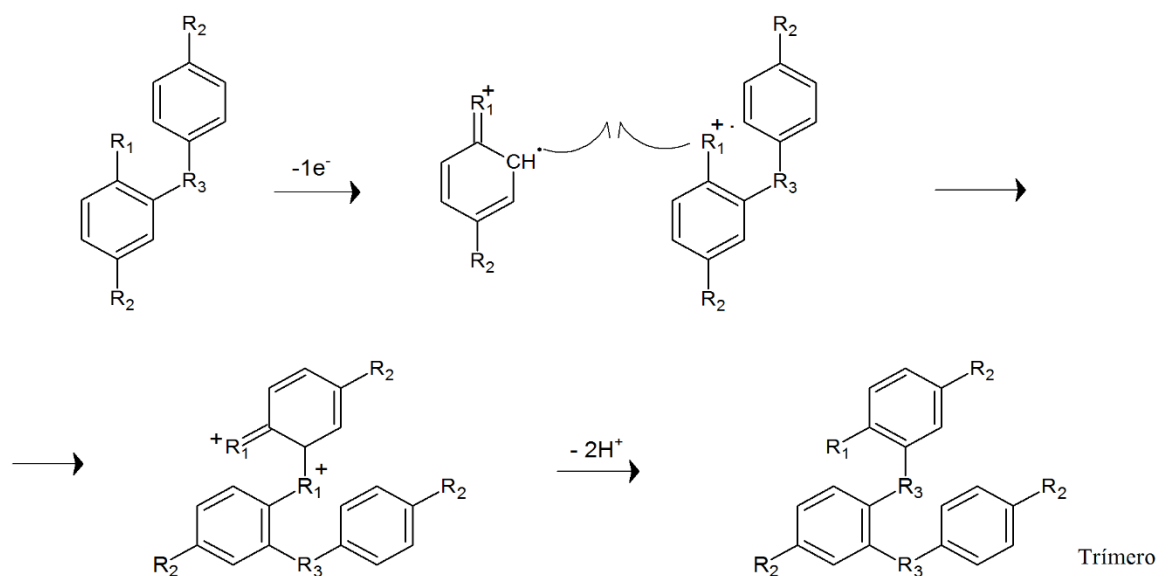


Etapa 2: Acoplamentos

Etapa 2.1: Formação de Dímeros



Etapa 2.2: Formação de Trímeros



Desta forma, na etapa II, o acoplamento entre dois cátions radicais (monômeros oxidados) forma um dicátion intermediário. A perda de dois prótons deste dicátion gera o produto de substituição, a amina secundária e, consequentemente, um dímero de carga neutra (Etapa 2.1). Através do dímero, um trímero é gerado seguindo o mesmo mecanismo (Etapa 2.2),

e consecutivamente a reação se multiplica, levando à formação de um tetrâmero até que grandes cadeias sejam formadas, caracterizando um polímero.

A presença de grupos C-NH-C/-COOH e C-NH-C/-CONH<sub>2</sub> no espectro de FTIR para o poli(4-ABA) e poli(4-ABZ), respectivamente, e C-O-C/COOH e C-O-C/-CONH<sub>2</sub> no espectro de FTIR para o poli(4-HBA) e poli(4-HBZ), respectivamente, e ainda considerando as análises de RMN suportam o mecanismo proposto mostrado na Figura 7 e indica que a unidade estrutural destes polímeros é aquela mostrada na Figura 6.

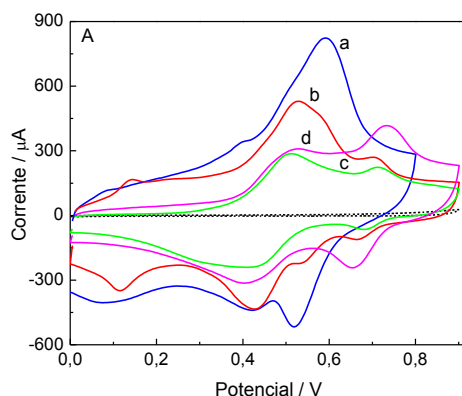
Para o poli(4-ABA) e poli(4-ABZ), a formação do produto principal ocorre como uma amina secundária, enquanto para o poli(4-HBA) e poli(4-HBZ), ocorre como éter aromático. Para o mecanismo proposto, os grupos carboxila do 4-ABA e do 4-HBA são preservados após a eletropolimerização, bem como os grupos amida da 4-ABZ e 4-HBZ.

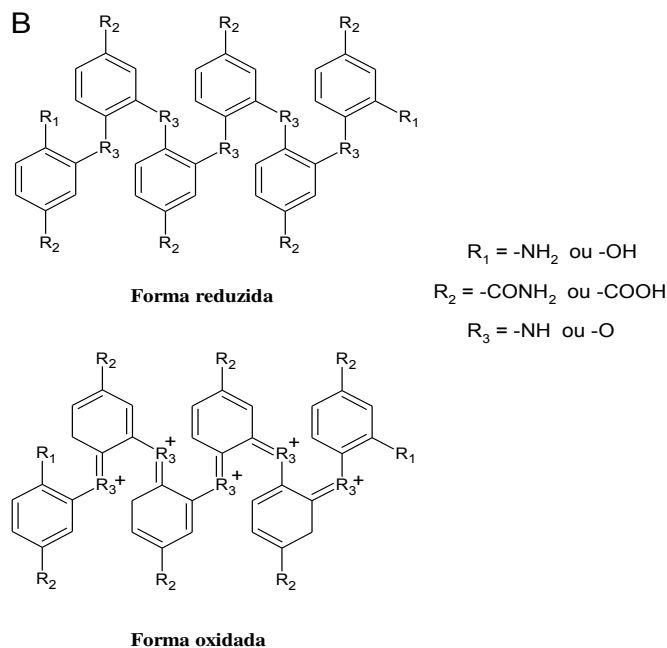
### 3.5 – Caracterização eletroquímica

A resposta eletroquímica do EG e dos eletrodos modificados obtidos em uma solução contendo o eletrólito suporte é mostrada na Figura 8. É evidente que um material eletroativo foi depositado na superfície dos eletrodos de grafite indicada pelos processos redox observados. Este comportamento redox entre +0,3 e +0,8 V ocorre na mesma faixa de potencial mostrada na Figura 2, indicando a formação e adsorção do filme polimérico.

Com base nas estruturas propostas para os polímeros mostrados na Figura 6, é possível prever as formas oxidadas e reduzidas destes polímeros (ver Fig. 8B) que justificam a eletroatividade do material adsorvido.

**Figura 8:** A) VCs registrados em solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M após a eletropolimerização do (---) EG, (a) poli(4-ABA)/EG, (b) poli(4-ABZ)/EG, (c) poli(4-HBA)/EG e (d) poli(4-HBZ)/EG.  $\nu = 100$  mV/s. B) Estruturas propostas para as formas oxidadas e reduzidas dos filmes poliméricos.

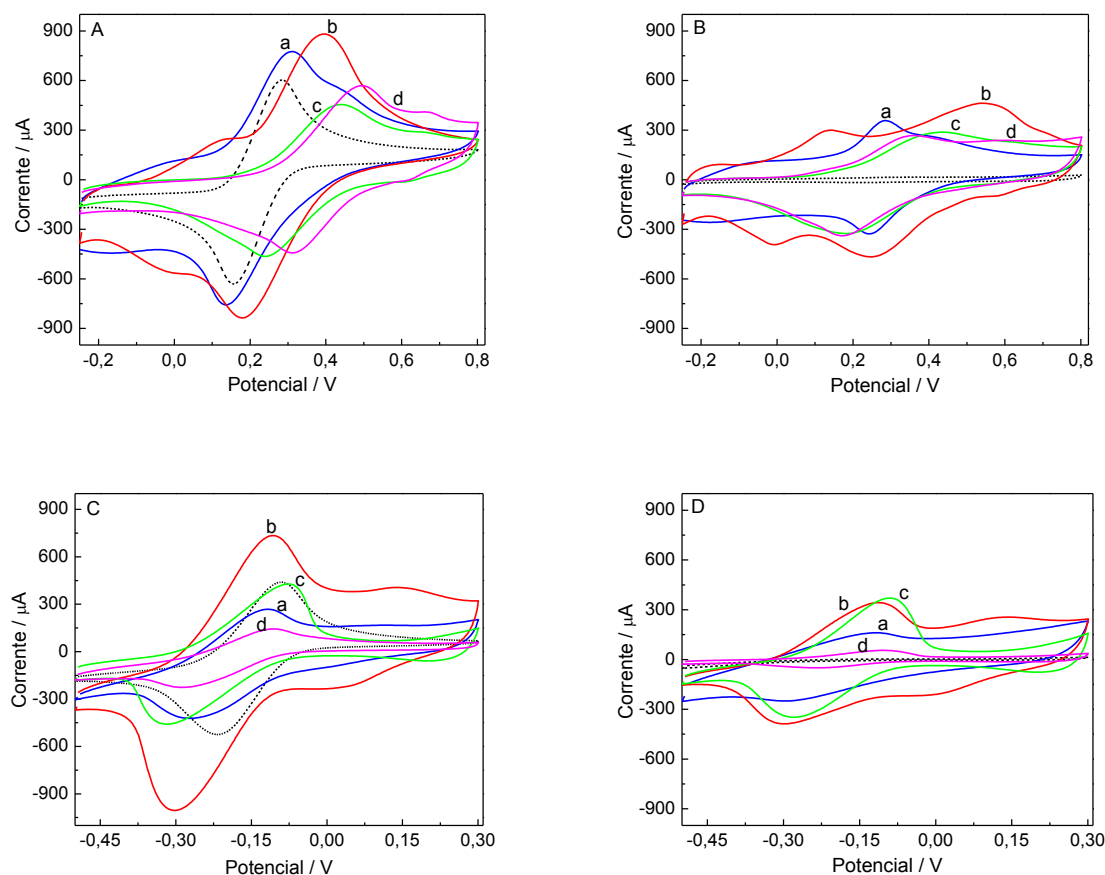




O comportamento eletroquímico dos eletrodos modificados também foi avaliado em uma solução contendo uma sonda redox aniônica e catiônica. A Figura 9A mostra que o EG tem uma resposta redox bem definida, isto é, o comportamento reversível do ferricianeto/ferrocianeto de potássio. Em contrapartida, o perfil voltamétrico dos eletrodos modificados apresentou  $\Delta E = 178 \text{ mV}$  para o poli(4-ABA),  $\Delta E = 217 \text{ mV}$  para o poli(4-ABZ),  $\Delta E = 203 \text{ mV}$  para o poli(4-HBA) e  $\Delta E = 184 \text{ mV}$  para o poli(4-HBZ). Estes valores de  $\Delta E$  são maiores em comparação com o EG não modificado, indicando que a reação de transferência de carga envolvendo a sonda redox é afetada pelos filmes formados, diminuindo a cinética de transferência de elétrons do par  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ .

Além disso, houve também um deslocamento para valores de  $E_{\text{pa}}$  mais positivos para todos os eletrodos modificados. Maiores valores de  $I_{\text{pa}}/I_{\text{pc}}$  para o poli(4-ABZ) e poli(4-ABA) e menores valores de  $I_{\text{pa}}/I_{\text{pc}}$  para o poli(4-HBZ) e poli(4-HBA) foram observados, mostrando que os eletrodos modificados apresentam comportamento de bloqueio significativo à reação de transferência de carga (OLIVEIRA, VIEIRA, ALVES *et al.*, 2010), ou seja, o material polimérico dificulta a transferência eletrônica entre o eletrodo e a solução, comprovando a modificação na superfície do eletrodo.

**Figura 9:** VCs registrados em (A)  $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$  5,0 mM contendo KCl 0,1 M e (B) em KCl 0,1 M; (C)  $Ru(NH_3)_6Cl_2/Ru(NH_3)_6Cl_3$  5,0 mM contendo KCl 0,1 M e (D) em KCl 0,1 M sobre EG e EG modificado.  $v = 100$  mV/s. Sendo: (---) EG, (a) poli(4-ABA)/EG, (b) poli(4-ABZ)/EG, (c) poli(4-HBA)/EG e (d) poli(4-HBZ)/EG.



O par redox ferrocianeto/ferrocianeto é sensível à carga superficial do eletrodo, uma vez que é carregado negativamente em ambos os estados redox (OLIVEIRA, VIEIRA, ALVES *et al.*, 2010b). Assim, no caso do poli(4-ABA) e poli(4-HBA) que possuem os grupos carboxílicos em comum, segundo Pellissier e colaboradores (2008), em solução aquosa de ferrocianeto/ferricianeto contendo KCl, pH 7, os grupos carboxílicos do polímero estão desprotonados, resultando em repulsão eletrostática entre as cargas negativas dos grupos carboxilato do polímero e a sonda redox, causando redução significativa da reação de transferência de elétrons entre o par redox e o eletrodo modificado (PELLISSIER, BARRIÈRE, DOWNARD *et al.*, 2008).

A Figura 9B mostra os voltamogramas cíclicos dos eletrodos obtidos apenas em KCl 0,1 M. Para o EG não modificado, nenhuma atividade eletroquímica é observada, portanto, a atividade eletroquímica que aparece para os eletrodos modificados refere-se ao filme polimérico.

A Figura 9C mostra a resposta do eletrodo em solução de cloreto de hexaminrutênio. Pode-se observar um processo redox para o EG, que corresponde a oxidação

em  $-0,09$  V e redução em  $-0,22$  V ( $\Delta E = 130$  mV). Para cada eletrodo modificado, o valor de  $\Delta E$  é maior, devido ao bloqueio parcial da superfície do eletrodo pelo filme polimérico, o que significa que a transferência eletrônica é dificultada sobre os eletrodos modificados, devido à interação eletrostática entre os filmes formados e a sonda redox.

A Figura 9D mostra os voltamogramas cíclicos obtidos na ausência da sonda redox. Observa-se que o EG não apresentou processo redox. Logo, é razoável dizer que o efeito observado na Figura 9C apresenta grandes contribuições para a eletroatividade dos filmes poliméricos.

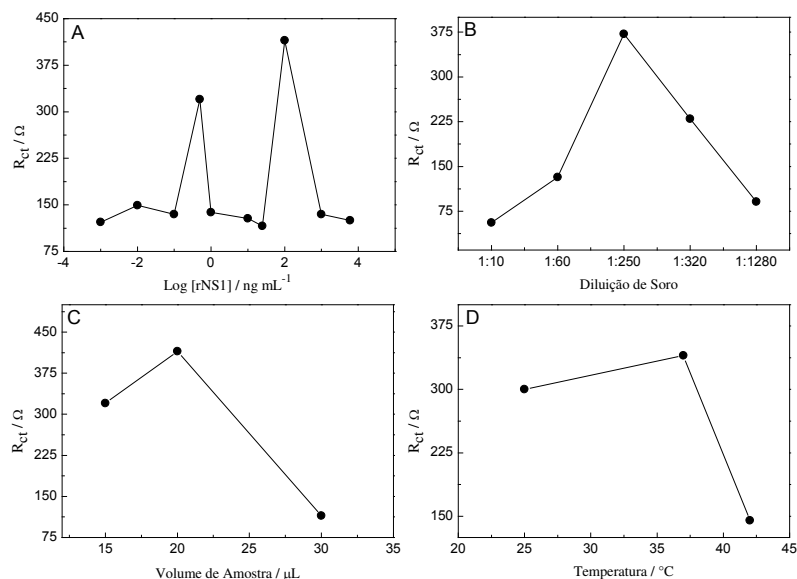
### **3.6 – Imobilização do antígeno rNS1 e detecção de anticorpos anti-NS1**

Para uma possível aplicação das plataformas investigadas neste trabalho, realizamos alguns estudos iniciais para o seu uso no desenvolvimento de biossensores. Portanto, considerando que cada monômero produziu uma superfície funcionalizada com características específicas, a imobilização do antígeno rNS1 foi realizada nestes transdutores. A sensibilidade do imunossensor para uma análise on/off para Dengue foi testada avaliando o comportamento do sensor na presença de anticorpos positivos e negativos para dengue obtidos a partir de amostras de soro humano.

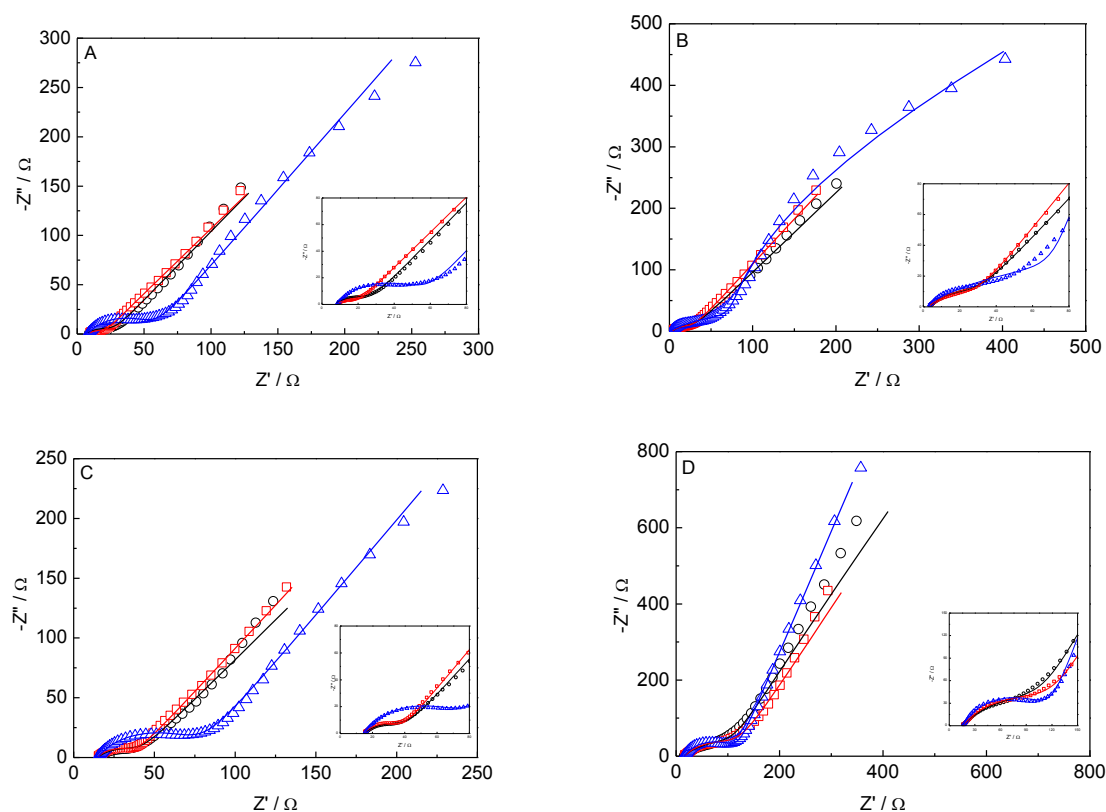
A etapa de imobilização do antígeno e a interação posterior com soros positivos e negativos foram realizadas com detecção impedimétrica. Os melhores parâmetros obtidos para este estudo foram:  $20\text{ }\mu\text{L}$  da solução do antígeno  $100,0\text{ }\mu\text{g/mL}$ ,  $20\text{ }\mu\text{L}$  dos soros em diluição de  $1/250$ , durante  $20\text{ min}$  a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , conforme mostra a Figura 10.

A Figura 11 mostra os diagramas de Nyquist para o eletrodo modificado após a etapa de imobilização nas condições otimizadas. Pode-se notar um semicírculo em altas frequências, relacionado a resistência à transferência de carga, e uma linha reta em baixas frequências, relacionada ao transporte de massa por difusão para todos os casos investigados.

**Figura 10:**  $R_{ct}$  em função de: (A) concentração de rNS1, (B) diluição de soro, (C) volume de amostra e (D) temperatura.



**Figura 11:** Diagrama de Nyquist de EIE obtido em  $\text{K}_4\text{Fe(CN)}_6/\text{K}_3\text{Fe(CN)}_6$  5,0 mM contendo KCl 0,1 M para: A) poli(4-ABA), B) poli(4-ABZ), C) poli(4-HBA) e D) poli(4-HBZ). Onde: (o) = Ag (antígeno); ( $\square$ ) = Ag-Ac<sup>-</sup> (interação do antígeno com anticorpo negativo) e ( $\Delta$ ) = Ag-Ac<sup>+</sup> (interação do antígeno com anticorpo positivo). [rNS1] = 100,0  $\mu\text{g/mL}$ . Diluição dos soros: 1/250. Amplitude: 10 mV. Faixa de frequência: 100 kHz a 10 mHz. As linhas sólidas representam a simulação de dados experimentais para um circuito equivalente. Inserção: regiões de alta frequência.



A Tabela 2 mostra os valores de resistência à transferência de carga ( $R_{ct}$ ) obtidos a partir da simulação de dados experimentais usando o circuito de Randles.

Pode ser verificado a partir da Tabela 2 que os valores de  $R_{ct}$  encontrados para a imunorreação Ag-Ac<sup>+</sup> do poli(4-HBA) é 30% superior ao  $R_{ct}$  do poli(4-ABA) e 12% superior para o poli(4-ABZ). Portanto, os melhores resultados foram obtidos para o eletrodo modificado com poli(4-ABA) e poli(4-HBA), uma vez que pode-se observar maior diferenciação entre os valores de  $R_{ct}$  para estes polímeros entre Ag e Ag-Ac<sup>+</sup> e também Ag e Ag-Ac<sup>-</sup>, indicando que o imunossensor proposto pode diferenciar os alvos positivos e negativos da Dengue.

**Tabela 2:** Valores de  $R_{ct}$  obtidos da simulação de EIE para o imunossensor e reação com anticorpos positivos e negativos para Dengue (n = 3).

<b>Plataforma</b>	<b>Ag <math>R_{ct} / \Omega</math></b>	<b>Ag-Ac<sup>-</sup> <math>R_{ct} / \Omega</math></b>	<b>Ag-Ac<sup>+</sup> <math>R_{ct} / \Omega</math></b>
<b>EG</b>	5,7 ± 2	9,2 ± 2	12,9 ± 3
<b>Poli(4-ABA)</b>	38,4 ± 4	41,6 ± 5	62,6 ± 5
<b>Poli(4-ABZ)</b>	53,6 ± 5	55,7 ± 4	73,3 ± 3
<b>Poli(4-HBA)</b>	50,2 ± 6	51,4 ± 5	81,5 ± 4
<b>Poli(4-HBZ)</b>	110,3 ± 9	111,5 ± 7	119,8 ± 5

Analisando o espectro de EIE (Fig. 11C) para o poli(4-HBA), os resultados mostram que os anticorpos negativos da dengue interagiram muito pouco com a rNS1. O valor de  $R_{ct}$  para o Ag-Ac<sup>-</sup> (51  $\Omega$ ) é apenas 2,4% maior que o valor encontrado para o eletrodo imobilizado com a rNS1. Isto é devido às interações não específicas com a rNS1, uma vez que as amostras de anticorpos são brutas. Por outro lado, é possível observar uma diferença quando comparado aos resultados da interação Ag-Ac<sup>+</sup> (82  $\Omega$ ) com o eletrodo imobilizado com a rNS1 (51  $\Omega$ ), representando um aumento de 62%, já que a interação da rNS1 é específica para os anticorpos positivos.

Com exceção do poli(4-HBZ), todas as outras plataformas são promissoras para a imobilização de biomoléculas considerando a etapa de imobilização e reconhecimento do alvo específico. Em nossos estudos, os filmes poliméricos que apresentaram os melhores resultados foram os derivados do ácido 4-aminobenzóico e do ácido 4-hidroxibenzóico. Entretanto, para o desenvolvimento de um imunossensor utilizando estes transdutores, estudos de otimização e validação precisam ser realizados.





#### 4. CONCLUSÃO

Este trabalho propôs o desenvolvimento e caracterização de plataformas eletroquímicas baseadas em eletrodo de grafite modificado com filmes poliméricos. Observou-se por MEV, VC e EIE, que a superfície do eletrodo modificado foi significativamente revestida pelo filme polimérico derivado do ácido 4-aminobenzóico (4-ABA), 4-aminobenzamida (4-ABZ), ácido 4-hidroxibenzóico (4-HBA) e 4-hidroxibenzamida (4-HBZ).

Um mecanismo de eletropolimerização foi proposto para os polímeros formados, onde este se baseou nos espectros de FTIR e RMN que sugeriram que a polimerização do 4-ABA e 4-ABZ afeta os grupos amino pela formação de aminas secundárias, enquanto os grupos carboxila e amida, respectivamente, são preservados. Para o 4-HBA e 4-HBZ, os grupos hidroxila são afetados pela polimerização, formando éteres difenílicos, já os grupos carboxila e amida, respectivamente, não participam do processo de polimerização.

Na etapa de imobilização das biomoléculas, pôde-se observar que as plataformas do poli(4-ABA) e poli(4-HBA) apresentaram maiores diferenciações nos valores de  $R_{ct}$ , mostrando um aumento de 65% e 62%, respectivamente, para a imunorreação Ag-Ac<sup>+</sup> em relação à rNS1. Desta forma, o objetivo foi escolher a melhor plataforma para estudos posteriores que permitam a construção de um imunossensor eletroquímico que forneça um diagnóstico rápido da Dengue, de baixo custo e seletivo, que permita o monitoramento *in situ*, facilmente miniaturizado e acessível.

Em um artigo futuro, pretendemos desenvolver um imunossensor utilizando eletrodos impressos em tela de grafite modificados com poli(4-ABA) ou poli(4-HBA) para detecção de Dengue. Neste dispositivo, estudos de otimização da modificação da plataforma (número de ciclos e velocidade de varredura) serão realizados, bem como do desenvolvimento do imunossensor: sensibilidade, seletividade, tempo de imobilização, tempo de imunorreação, BSA, concentração de rNS1, estabilidade, interferências e validação do dispositivo.



## REFERÊNCIAS

- AHUJA, T.; MIR, I. A.; KUMAR, D. Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. **Biomaterials**, v. 28, n. 5, p. 791-805, 2007.
- ALVES, M. F.; CORRÊA, R. A. M. S.; DA CRUZ, F. S.; FRANCO, D. L. Electrochemical enzymatic fenitrothion sensor based on a tyrosinase/poly (2-hydroxybenzamide)-modified graphite electrode. **Analytical biochemistry**, v. 553, p. 15-23, 2018.
- ALVES, R. F.; SILVA, A. G.; FERREIRA, L. F.; FRANCO, D. L. Synthesis and characterization of a material derived from 4-mercaptobenzoic acid: A novel platform for oligonucleotide immobilization. **Talanta**, v. 165, p. 69-75, 2017.
- AWUZIE, C. I. Conducting Polymers. **Materials Today: Proceedings**, v. 4, n. 4, Part E, p. 5721-5726, 2017.
- BENYOUCEF, A.; HUERTA, F.; FERRAHI, M. I.; MORALLON, E. Voltammetric and in situ FT-IRS study of the electropolymerization of o-aminobenzoic acid at gold and graphite carbon electrodes: Influence of pH on the electrochemical behaviour of polymer films. **Journal of electroanalytical Chemistry**, v. 624, n. 1-2, p. 245-250, 2008.
- BEREKET, G.; DURAN, B. Anticorrosive properties of electrosynthesized poly(m-aminophenol) on copper from aqueous phenylphosphonic acid solution. **Progress in Organic Coatings**, v. 64, n. 1, p. 57-66, 2009/01/01/ 2009.
- BHATT, S.; GETHING, P. W.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504, 2013.
- CORRÊA, R.; DA CRUZ, F.; SANTOS, C.; PIMENTA, T. Optimization and Application of Electrochemical Transducer for Detection of Specific Oligonucleotide Sequence for Mycobacterium tuberculosis. **Biosensors**, v. 8, n. 3, p. 84, 2018.
- D'ERAMO, F.; ZÓN, M. A.; FERNÁNDEZ, H.; SERENO, L. Studies of a novel conducting polymer by cyclic and square wave voltammetries: Its synthesis and characterization. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 24, p. 7182-7190, 2008.
- DA CRUZ, F. S.; SOUZA, F. P.; FRANCO, D. L.; DOS SANTOS, W. T. P. Electrochemical detection of uric acid using graphite screen-printed electrodes modified with Prussian blue/poly (4-aminosalicylic acid)/Uricase. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 806, p. 172-179, 2017.
- DESHPANDE, M.; AMALNERKAR, D. Biosensors prepared from electrochemically-synthesized conducting polymers. **Progress in polymer science**, v. 18, n. 4, p. 623-649, 1993.
- FERREIRA, L. F.; BOODTS, J. F.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Gold electrodes modified with poly (4-aminophenol): incorporation of nitrogenated bases and an oligonucleotide. **Polymer International**, v. 57, n. 4, p. 644-650, 2008.

FERREIRA, L. F.; SANTOS, C. C.; DA CRUZ, F. S.; CORREA, R. A. Preparation, characterization, and application in biosensors of functionalized platforms with poly (4-aminobenzoic acid). **Journal of materials science**, v. 50, n. 3, p. 1103-1116, 2015.

FERREIRA, L. F.; SOUZA, L. M.; FRANCO, D. L.; CASTRO, A. C. H. Formation of novel polymeric films derived from 4-hydroxybenzoic acid. **Materials Chemistry and Physics**, v. 129, n. 1, p. 46-52, 2011/09/15/ 2011.

FRANCO, D. L.; AFONSO, A. S.; VIEIRA, S. N.; FERREIRA, L. F. Electropolymerization of 3-aminophenol on carbon graphite surface: Electric and morphologic properties. **Materials Chemistry and Physics**, v. 107, n. 2-3, p. 404-409, 2008.

GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. Application of conducting polymers to biosensors. **Biosensors and bioelectronics**, v. 17, n. 5, p. 345-359, 2002.

GRANLUND, T.; NYBERG, T.; STOLZ ROMAN, L.; SVENSSON, M. Patterning of polymer light-emitting diodes with soft lithography. **Advanced materials**, v. 12, n. 4, p. 269-273, 2000.

GRIESE, S.; KAMPOURIS, D. K.; KADARA, R. O.; BANKS, C. E. A critical review of the electrocatalysis reported at C60 modified electrodes. **Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis**, v. 20, n. 14, p. 1507-1512, 2008.

HEINZE, J. Electronically conducting polymers. In: (Ed.). **Electrochemistry IV**: Springer, 1990. p.1-47.

INZELT, G.; PINERI, M.; SCHULTZE, J.; VOROTYNTSEV, M. Electron and proton conducting polymers: recent developments and prospects. **Electrochimica Acta**, v. 45, n. 15-16, p. 2403-2421, 2000.

JANATA, J.; JOSOWICZ, M. Conducting polymers in electronic chemical sensors. **Nature materials**, v. 2, n. 1, p. 19, 2003.

LANGE, U.; ROZNYATOVSKAYA, N. V.; MIRSKY, V. M. Conducting polymers in chemical sensors and arrays. **Analytica chimica acta**, v. 614, n. 1, p. 1-26, 2008.

LI, J.; LIN, X. Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in poly (o-aminophenol) film on polypyrrole-Pt nanocomposite modified glassy carbon electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 12, p. 2898-2905, 2007.

LOFRANO, R.; MADURRO, J.; ABRANTES, L.; ROMERO, J. Electrocatalytic hydrogenation of carbonylic compounds using an electrode with platinum particles dispersed in films of poly-[allyl ether p-(2-aminoethyl) phenol] co-polymerized with allyl phenyl ether. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 218, n. 1, p. 73-79, 2004.

MA, X.; LI, G.; XU, H.; WANG, M. Preparation of polythiophene composite film by in situ polymerization at room temperature and its gas response studies. **Thin Solid Films**, v. 515, n. 4, p. 2700-2704, 2006.

MU, S. Electrochemical copolymerization of aniline and o-aminophenol. **Synthetic Metals**, v. 143, n. 3, p. 259-268, 2004.

MURRAY, R. W.; EWING, A. G.; DURST, R. A. Chemically modified electrodes. Molecular design for electroanalysis. **Analytical Chemistry**, v. 59, n. 5, p. 379A-390A, 1987.

OHNUKI, Y.; MATSUDA, H.; OHSAKA, T.; OYAMA, N. Permselectivity of films prepared by electrochemical oxidation of phenol and amino-aromatic compounds. **Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry**, v. 158, n. 1, p. 55-67, 1983.

OKABAYASHI, K.; GOTO, F.; ABE, K.; YOSHIDA, T. Electrochemical studies of polyaniline and its application. **Synthetic Metals**, v. 18, n. 1-3, p. 365-370, 1987.

OLIVEIRA, R. M.; VIEIRA, S. N.; ALVES, H. C.; FRANÇA, E. G. Electrochemical and morphological studies of an electroactive material derived from 3-hydroxyphenylacetic acid: a new matrix for oligonucleotide hybridization. **Journal of Materials Science**, v. 45, n. 2, p. 475-482, 2010a.

OLIVEIRA, R. M.; VIEIRA, S. N.; ALVES, H. C.; FRANÇA, E. G. Electrochemical and morphological studies of an electroactive material derived from 3-hydroxyphenylacetic acid: a new matrix for oligonucleotide hybridization. **Journal of Materials Science**, v. 45, n. 2, p. 475, 2010b.

PANG, Y.; LI, X.; DING, H.; SHI, G. Electropolymerization of high quality electrochromic poly (3-alkyl-thiophene) s via a room temperature ionic liquid. **Electrochimica acta**, v. 52, n. 20, p. 6172-6177, 2007.

PELLISSIER, M.; BARRIÈRE, F.; DOWNARD, A. J.; LEECH, D. Improved stability of redox enzyme layers on glassy carbon electrodes via covalent grafting. **Electrochemistry Communications**, v. 10, n. 6, p. 835-838, 2008.

PIMENTA, T. C.; SANTOS, C. C.; THOMASINI, R. L.; FERREIRA, L. F. Impedimetric immunosensor for dengue diagnosis using graphite screen-printed electrodes coated with poly (4-aminophenylacetic acid). **Biomedical microdevices**, v. 20, n. 3, p. 78, 2018.

RODRIGUES, L. P.; FERREIRA, D. C.; SONODA, M. T.; MADURRO, A. G. B. Electropolymerization mechanisms of hydroxyphenylacetic acid isomers. **Journal of Molecular Structure**, v. 1072, p. 298-306, 2014.

RONCALI, J. Conjugated poly (thiophenes): synthesis, functionalization, and applications. **Chemical Reviews**, v. 92, n. 4, p. 711-738, 1992.

SALAVAGIONE, H. J.; ARIAS, J.; GARCÉS, P.; MORALLÓN, E. Spectroelectrochemical study of the oxidation of aminophenols on platinum electrode in acid medium. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 565, n. 2, p. 375-383, 2004.

SAMET, Y.; KRAIEM, D.; ABDELHÉDI, R. Electropolymerization of phenol, o-nitrophenol and o-methoxyphenol on gold and carbon steel materials and their corrosion protection effects. **Progress in Organic Coatings**, v. 69, n. 4, p. 335-343, 2010.

SAYRE, C. N.; COLLARD, D. M. Self-assembled monolayers of pyrrole-containing alkanethiols on gold. **Langmuir**, v. 11, n. 1, p. 302-306, 1995.

SHA, Y.; QIAN, L.; MA, Y.; BAI, H. Multilayer films of carbon nanotubes and redox polymer on screen-printed carbon electrodes for electrocatalysis of ascorbic acid. **Talanta**, v. 70, n. 3, p. 556-560, 2006.

SU, C.; WANG, L.; XU, L.; ZHANG, C. Synthesis of a novel ferrocene-contained polypyrrole derivative and its performance as a cathode material for Li-ion batteries. **Electrochimica Acta**, v. 104, p. 302-307, 2013.

SYED, A. A.; DINESAN, M. K. Polyaniline - A novel polymeric material. **Talanta**, v. 38, n. 8, p. 815-837, 1991.

TAN, K.; TAN, B.; KHOR, S.; NEOH, K. The effects of synthesis conditions on the characteristics and chemical structures of polyaniline: A comparative study. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 52, n. 5, p. 673-680, 1991.

WALTMAN, R.; BARGON, J. Electrically conducting polymers: a review of the electropolymerization reaction, of the effects of chemical structure on polymer film properties, and of applications towards technology. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 76-95, 1986.

WAN, M. The influence of polymerization method and temperature on the absorption spectra and morphology of polyaniline. **Synthetic metals**, v. 31, n. 1, p. 51-59, 1989.

WISHART, D. S.; KNOX, C.; GUO, A. C.; EISNER, R. HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. **Nucleic acids research**, v. 37, n. suppl\_1, p. D603-D610, 2008.

XIE, Y.; JIANG, F.; XU, J.; ZENG, L. Electrosyntheses and characterization of poly (9-bromophenanthrene) in boron trifluoride diethyl etherate. **European Polymer Journal**, v. 45, n. 2, p. 418-425, 2009.

## **CAPÍTULO 2 - UMA NOVA FERRAMENTA PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO POR VÍRUS DA DENGUE: OTIMIZAÇÃO E DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-NS1 EM AMOSTRAS DE SORO POR TRANSDUTORES IMPEDIMÉTRICOS**

### **RESUMO**

Um imunossensor impedimétrico baseado na detecção de anticorpos específicos anti-NS1 do vírus da dengue (DENV), acoplados a eletrodos impressos de grafite (EIG) modificados com poli(ácido 4-aminobenzóico), poli(4-ABA), foi desenvolvido com êxito para o diagnóstico do DENV. A eletropolimerização do 4-ABA sobre os eletrodos impressos de grafite em solução de ácido sulfúrico 0,5 M foi obtida com a aplicação de 20 ciclos de potencial a 100 mV/s por voltametria cíclica. Diferentes concentrações da proteína recombinante não estrutural 1 (rNS1) preparadas em tampão HBS-EP pH 7,4 foram imobilizadas na superfície do EIG, as melhores respostas foram obtidas para 0,1 ng/mL. Albumina de soro bovino (BSA) 1% foi utilizada para bloqueio após a imobilização do antígeno. Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foi utilizada para detectar as interações biomoleculares para amostras de soro de camundongos imunizados. Estudos da otimização do tempo de imobilização de antígenos (rNS1) e BSA mostraram 20 min e 5 min, respectivamente, como tempos ótimos. O melhor tempo de resposta do imunossensor foi de 30 min para a interação antígeno-anticorpo. Em diluições de 1:1280 das amostras de soro, uma diferença de 70% entre as amostras específicas e não específicas foi observada. A seletividade do dispositivo foi estudada na presença dos interferentes ácido úrico, glicose, água e tampão HBS-EP, e os resultados obtidos mostraram boa seletividade do imunossensor, visto que a resposta para todos os interferentes foi irrelevante quando comparada à resposta do  $Ac^+$  específico. A reprodutibilidade e repetibilidade do imunossensor foram investigadas e um desvio padrão relativo (DPR) de 0,97% e 1,27%, respectivamente, foi alcançado. A estabilidade do imunossensor foi monitorada durante um período de 45 dias de armazenamento a 4,0 °C com queda na resposta de 19%. Análises de validação foram conduzidas com amostras de soro humano, após confirmação destas com o teste sorológico de ELISA. Diferentes soros foram testados para a presença do antígeno rNS1 pelo teste rápido comercial da Bioclin, e os diagnósticos foram confirmados pelo método impedimétrico utilizado neste trabalho. Estes resultados confirmam que o imunossensor desenvolvido foi capaz de detectar os anticorpos anti-NS1 em amostras reais de soro de pacientes infectados com DENV e que este dispositivo pode ser uma alternativa prática para o diagnóstico da doença.

**Palavras-chave:** eletrodos impressos de grafite; poli(ácido 4-aminobenzóico); rNS1; Dengue; imunossensores; espectroscopia de impedância eletroquímica.



## ABSTRACT

An impedimetric immunosensor based on the detection of specific dengue virus anti-NS1 antibodies (DENV), coupled to poly(4-aminobenzoic acid), poly(4-ABA), modified graphite printed electrodes (SPE), was successfully developed for the diagnosis of DENV. The electropolymerization of 4-ABA on the graphite electrodes printed in 0.5 M sulfuric acid solution was obtained with the application of 20 potential cycles at 100 mV/s by cyclic voltammetry. Different concentrations of the nonstructural recombinant protein 1 (rNS1) prepared in HBS-EP pH 7.4 buffer were immobilized on the surface of the SPE, the best responses were obtained to 0.1 ng/mL. Bovine serum albumin (BSA) 1% was used for blockade after immobilization of the antigen. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) was used to detect the biomolecular interactions for serum samples from immunized mice. Studies of the optimization of antigen immobilization time (rNS1) and BSA showed 20 min and 5 min, respectively, as optimal times. The best response time of the immunosensor was 30 min for the antigen-antibody interaction. At 1:1280 dilutions of the serum samples, a difference of 70% between the specific and non-specific samples was observed. The selectivity of the device was studied in the presence of interfering uric acid, glucose, water and HBS-EP buffer, and the results obtained showed good selectivity of the immunosensor, since the response for all the interferents was irrelevant when compared to the specific  $\text{Ac}^+$  response. Reproducibility and repeatability of the immunosensor were investigated and a relative standard deviation (RSD) of 0.97% and 1.27%, respectively, was achieved. Stability of the immunosensor was monitored over a 45 day storage period at 4.0 °C with a 19% drop in response. Validation analyzes were carried out with human serum samples, after confirmation of these with the ELISA serological test. Different serums were tested for the presence of rNS1 antigen by the commercial rapid test of Bioclin, and the diagnoses were confirmed by the impedimetric method used in this study. These results confirm that the developed immunosensor was able to detect anti-NS1 antibodies in real serum samples from patients infected with DENV and that this device may be a practical alternative for the diagnosis of the disease.

**Keywords:** graphite printed electrodes, poly(4-aminobenzoic acid); rNS1 protein; Dengue; immunosensors; electrochemical impedance spectroscopy.



## 1. INTRODUÇÃO

No momento atual, a Dengue é considerada um grave problema de saúde pública, e encontra-se predominantemente endêmica em mais de 120 países, nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Nos últimos 50 anos, a incidência desta doença aumentou, uma vez que, cerca de 3,6 bilhões de pessoas vivem em áreas endêmicas (BEATTY, STONE, FITZSIMONS *et al.*, 2010; GUZMAN, GUBLER, IZQUIERDO *et al.*, 2016).

A Organização Mundial da Saúde estima que 2,35 milhões de casos de Dengue foram registrados em 2015 apenas nas Américas, dos quais 10.200 casos foram diagnosticados como dengue grave, causando 1.181 mortes. Em 2017, houve uma redução significativa no número de casos de Dengue nas Américas de 2,18 milhões de casos em 2016 para 584.263 casos em 2017 (uma redução de 73%) (WHO, 2019). Contudo, um aumento nos casos está sendo observado em 2019. Especificamente no Brasil, até 23 de março de 2019, foram registrados 273.193 casos prováveis de Dengue no país, com uma incidência de 131,0 casos/100 mil hab. No mesmo período de 2018, haviam sido registrados 71.525 casos prováveis (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

A Dengue é uma infecção causada pelo vírus DENV, pertencente ao gênero *flavivirus* (PARKASH e SHUEB, 2015). O agente etiológico da Dengue possui quatro sorotipos mais frequentes (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), sendo que as características clínicas variam, dependendo da incidência (infecção primária ou secundária) (DARWISH, TAHA, ALIAS *et al.*, 2015), de uma doença febril não específica (febre da dengue) às condições fatais como a febre hemorrágica da dengue e a síndrome do choque da dengue (SINGHI, KISSOON e BANSAL, 2007). O quinto sorotipo do vírus (DENV-5) foi reportado por Normile em 2013, onde o DENV-5 foi detectado durante a triagem de amostras virais no Hospital em Sarawak, estado da Malásia, no ano de 2007 (NORMILE, 2013).

A transmissão da Dengue em humanos ocorre através da picada do mosquito da espécie *Aedes aegypti* (TELES, 2011), a grande maioria dos hospedeiros são assintomáticos, dentre os indivíduos com manifestações clínicas, o quadro clínico de Dengue pode variar desde a forma clássica sem sinais de alarme, até a forma grave com sinais de alarme (ex: vômitos, dor abdominal intensa, hepatomegalia dolorosa, desconforto respiratório, letargia). Como a transmissão acontece através da picada do mosquito, a prevenção da Dengue deve ser feita evitando-se a disseminação deste vetor. Neste cenário e na ausência de vacinas com alta eficácia ou de tratamentos eficientes (TELES, 2011), é desejável ter um método de diagnóstico rápido, preciso e prático para a detecção precoce do vírus da Dengue, e que permita o

gerenciamento imediato de pacientes e o controle da disseminação (SINAWANG, RAI, IONESCU *et al.*, 2016; SINGHI, KISSOON e BANSAL, 2007).

Existem vários métodos laboratoriais atualmente disponíveis para o diagnóstico da doença. Algumas tradicionais técnicas para o diagnóstico da Dengue incluem testes sorológicos, como um ensaio imunoenzimático de captura de imunoglobulina M (IgM) (MAC-ELISA) (BARKHAM, CHUNG, TANG *et al.*, 2006), isolamento viral em cultura de células (SAMUEL e TYAGI, 2006; YAMADA, TAKASAKI, NAWA *et al.*, 2002) e detecção de RNA viral por reação em cadeia da polimerase de transcriptase reversa (RT-PCR) (DASH, PARIDA, SANTHOSH *et al.*, 2008; RAENGSAKULRACH, NISALAK, MANEEKARN *et al.*, 2002).

Vários testes de laboratório disponíveis para o diagnóstico da doença apresentam algumas limitações. Os testes sorológicos são geralmente não específicos porque as imunoglobulinas para o vírus da Dengue sofrem reações cruzadas com outros anticorpos de *flavivírus* (WATTHANAWORAWIT, TURNER, TURNER *et al.*, 2011). O MAC-ELISA, que é um ensaio comumente utilizado, é um teste insuficiente para a confirmação diagnóstica da Dengue, uma vez que dependendo do estado do paciente, e se a infecção for muito grave, não é possível que ele espere muito tempo para que um diagnóstico seja definido, como é o caso da detecção sorológica dos anticorpos do tipo IgM e IgG. Além disso, este tipo de teste apresenta baixa sensibilidade nos primeiros quatro dias da doença (ALCON, TALARMIN, DEBRUYNE *et al.*, 2002) e necessita de um prazo de no mínimo cinco dias após o início dos sintomas, para que o vírus possa ser detectável através dos testes convencionais.

O isolamento do vírus em cultura de células, embora seja altamente específico, é pouco sensível e muito laborioso, a metodologia requer um longo tempo de incubação (7-12 dias) (PARKASH e SHUEB, 2015; SUWANDONO, KOSASIH, KUSRIASTUTI *et al.*, 2006). Os estudos de Yamada e colaboradores (2002) concluíram que em relação ao diagnóstico laboratorial da infecção aguda pelo vírus da Dengue, quando os pacientes apresentam febre, o isolamento do vírus da Dengue e RT-PCR são geralmente positivos e quando a febre diminui, estes métodos são geralmente negativos. No entanto, deve-se notar que existem exceções, uma vez que amostras de vírus foram isoladas de algumas das amostras de sangue coletadas após a defervescência (YAMADA, TAKASAKI, NAWA *et al.*, 2002).

O diagnóstico baseado na RT-PCR é usado para detectar o RNA viral e apesar da especificidade e sensibilidade serem altas trata-se de um processo dispendioso, laborioso e de mão de obra muito especializada (DARWISH, TAHA, ALIAS *et al.*, 2015; TELES, 2011), podendo ainda gerar falsos positivos (GUZMÁN e KOURI, 2004). Além destes métodos moleculares serem demorados (HUY, HANH, THUY *et al.*, 2011), eles são muito caros, o que

os tornam inviáveis para a detecção do vírus da Dengue. Neste contexto, o diagnóstico precoce de Dengue continua a ser um problema, já que todos esses ensaios mencionados têm suas próprias desvantagens.

Diante das limitações dos métodos tradicionais, é indispensável o estudo por novas metodologias que possam realizar um diagnóstico no qual seja possível uma confirmação da infecção pelo vírus da Dengue logo após o início dos sintomas. Comparado com testes convencionais para detecção do vírus da Dengue, os biossensores e, principalmente, imunossensores eletroquímicos, têm recebido maior atenção devido às vantagens que eles apresentam, como sensibilidade, simplicidade, especificidade (KRYSCIO e PEPPAS, 2012), respostas mais rápidas e quantitativas, possibilidade de miniaturização e podem permitir o monitoramento no local (DAI, CAI, ZHAO *et al.*, 2011).

Até o momento, diversos imunossensores foram desenvolvidos para a detecção direta da proteína não estrutural 1 (NS1), uma vez que esta proteína aparece já no 1º dia de infecção, além de ser encontrada nas infecções primárias e secundárias. Entretanto, este trabalho traz uma proposta diferente, visto que 90% dos trabalhos reportados na literatura (ALCON, TALARMIN, DEBRUYNE *et al.*, 2002; CAVALCANTI, I., SILVA, PERES *et al.*, 2012; CAVALCANTI, GUEDES, SOTOMAYOR *et al.*, 2012; CECCHETTO, CARVALHO, SANTOS *et al.*, 2015; DARWISH, ALRAWI, SEKARAN *et al.*, 2016; DIAS, GOMES-FILHO, SILVA *et al.*, 2013; NAWAZ, HAYAT, CATANANTE *et al.*, 2018; SANTOS, BUENO e DAVIS, 2018) propõem a detecção da NS1 para o diagnóstico da Dengue, foram investigadas a construção e otimização de um imunossensor impedimétrico para a detecção de anticorpos anti-NS1 baseados na imobilização da proteína recombinante não estrutural 1 (rNS1) sob eletrodos impressos de grafite funcionalizados com filmes poliméricos derivados de monômeros fenólicos e da anilina com base nos estudos prévios reportados por Santos e colaboradores e Pimenta e colaboradores (SANTOS, PIMENTA, THOMASINI *et al.*, 2019; PIMENTA, SANTOS, THOMASINI *et al.*, 2018)



## 2. METODOLOGIA

### 2.1 – Materiais

Ácido 4-aminobenzóico (4-ABA, 99%) foi adquirido da Alfa Aesar (Ward Hill, EUA). 4-aminobenzamida (4-ABZ, 98%), ácido 4-hidroxibenzoico (4-HBA,  $\geq 99\%$ ), 4-hidroxibenzamida (4-HBZ, 98%), hexacianoferrato de potássio (II) tri-hidratado ( $\geq 99.5\%$ ), hexacianoferrato de potássio (III) ( $\geq 99\%$ ), ácido sulfúrico (reagente ACS), cloreto de potássio ( $\geq 99\%$ ), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA,  $\geq 99\%$ ), cloreto de sódio ( $\geq 99.5\%$ ), Hepes ( $\geq 99.5\%$ ) e albumina de soro bovino (BSA,  $\geq 98\%$ ) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Glicose anidro foi adquirida da LAFAN Química Fina e ácido úrico da Vetec. Todos os reagentes foram utilizados como recebidos e sem etapas de purificação preparados em água deionizada (18,2 M $\Omega$ .cm), obtida pelo sistema Master System MS2000 da Gehaka. Todas as soluções foram preparadas antes do uso e desoxigenadas com N<sub>2(g)</sub> durante 10 min antes da utilização.

A solução tampão HBS-EP a pH 7,4 foi utilizada para a dissolução das amostras biológicas. Esta solução foi preparada misturando-se Hepes 10 mM (pH 7,4), EDTA 3,0 mM (pH 8,0) e NaCl 150 mM.

Para todas as medidas eletroquímicas foi utilizado um Potenciostato/Galvanostato da Autolab®, modelo PGSTAT 128N, acoplado a um computador com módulo FRA32M e software Nova 2.1 e eletrodos impressos de grafite modelo DRP-110, adquiridos da DropSens®.

Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram realizadas em solução aquosa de K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 5,0 mM contendo KCl 0,1 M com a aplicação de um potencial de circuito aberto (OCP). A faixa de frequência investigada foi de 100 kHz a 10 mHz, com amplitude de excitação sinusoidal de 10 mV. A análise dos espectros de impedância foi feita por ajuste dos resultados experimentais para um circuito equivalente usando o software Nova 2.1.

### 2.2 – Produção da rNS1 e amostras de soros

A proteína recombinante não estrutural 1 (rNS1) da Dengue foi produzida conforme procedimento descrito por Pimenta e colaboradores (PIMENTA, SANTOS, THOMASINI *et al.*, 2018).

As amostras de soro humano foram obtidas de um banco de pacientes diagnosticados com DENV e pacientes saudáveis, enquanto soros imunizados com a proteína rNS1 foram obtidos de camundongos (Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG - Brasil - banco de amostras - Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Dengue e Microrganismo Hospedeiro de Interação).

Amostras de soro de coelho foram obtidas a partir de coelhos machos imunizados com injeções intravenosas de  $10^7$  PFU do vírus da Dengue 1, 2, 3 e 4. O soro foi recolhido cinco dias após a infecção. Estes soros foram gentilmente cedidos pela Dra. Erna Geessien Kroon do Laboratório de Vírus da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

### 2.3 – Formação dos filmes poliméricos

Antes da eletropolimerização os eletrodos impressos de grafite (EIG) foram eletroquimicamente tratados utilizando-se a voltametria cíclica (VC) através da adição de 70  $\mu$ L de solução de ácido sulfúrico 0,5 M à superfície do eletrodo. Nesta etapa, três ciclos de potencial consecutivos foram realizados na faixa de potencial de -0,2 a +1,2 V para o 4-ABA, -0,2 a +1,3 V para a 4-ABZ, -0,4 a +1,4 V para o 4-HBA e -0,5 a +1,3 V para a 4-HBZ. Após esta etapa, os EIG foram avaliados em solução aquosa de ferrocianeto/ferricianeto de potássio 5,0 mM contendo KCl 0,1 M na faixa de potencial de -0,55 a +0,80 V, utilizando-se 70  $\mu$ L desta solução sobre a superfície do eletrodo.

Após o pré-tratamento, a eletrogeração dos filmes poliméricos foi realizada por VC, onde 70  $\mu$ L da solução monomérica (2,5 mM preparada em ácido sulfúrico 0,5 M) foi colocada sobre a superfície dos EIG. Então, 10 ciclos de potencial consecutivos, na velocidade de varredura de 50 mV/s, foram realizados na faixa de potencial utilizada no pré-tratamento.

### 2.4 – Análise dot blot

O teste dot blot foi realizado para confirmar o resultado de um conjunto de nove amostras de soro de camundongos que foram imunizados com a proteína rNS1, sendo cinco destas amostras positivas e quatro utilizadas como controle negativo.

Cubas de acrílico foram utilizadas como suporte para a realização do procedimento, onde membranas de nitrocelulose de 6 mm x 6 cm (porosidade de 0,45  $\mu$ m) foram revestidas com 2  $\mu$ L de antígeno rNS1 puro e, em seguida, bloqueadas com 500  $\mu$ L de solução tampão de bloqueio (100 mM de Tris-HCl, pH 7,0; 150 mM de NaCl; 0,1% de Tween 20 e albumina de



soro bovino (BSA) a 2%) por 30 min a 37 °C. Após isso, as membranas revestidas foram incubadas com 250 µL de cada uma das nove amostras de soro de camundongo diluição 1:1000 durante 30 min a 37 °C. Logo depois, lavou-se com solução tampão de lavagem (100 mM de Tris-HCl, pH 7,0; 150 mM de NaCl; 0,1% de Tween 20 e 0,2% de BSA), 3 vezes por 5 min. As membranas foram incubadas com 200 µL do conjugado anti-IgG humano em diluição de 1:1000 por 30 min a 37 °C e lavadas 3 vezes por 5 min com tampão de lavagem e água destilada.

As reações foram reveladas com solução de 3,3'-diaminobenzidina/peróxido de hidrogênio, onde colocou-se 200 µL desta solução em cada cuba por 5 min à temperatura ambiente. Em seguida, lavou-se com água destilada e fotografou-se imediatamente. Os “dots” foram avaliados visualmente comparando a intensidade da coloração.

## 2.5 – Construção do imunossensor impedimétrico

Santos e colaboradores (2019) realizaram um estudo da formação e caracterização das plataformas de poli(4-ABA), poli(4-ABZ), poli(4-HBA) e poli(4-HBZ) sobre eletrodos de grafite (EG) (SANTOS, PIMENTA, THOMASINI *et al.*, 2019). Neste estudo, foi sintetizado, caracterizado (eletroquimicamente, morfológicamente e estruturalmente) e proposto um mecanismo de eletropolimerização para obtenção de filmes poliméricos derivados destes monômeros. Então, diante dos resultados obtidos e com o objetivo de miniaturizar e otimizar o sistema de detecção, e considerando que cada monômero produziu uma superfície funcionalizada com características específicas, a imobilização da rNS1 foi realizada, neste trabalho, sobre EIG por adsorção física. Os parâmetros utilizados na etapa de imobilização da rNS1 para este estudo foram: 30 µL da solução de antígeno 1,0 ng/mL durante 20 min em estufa à 37 °C.

Em seguida, o imunossensor foi colocado na presença de amostras de soro humano contendo anticorpos específicos e amostras inespecíficas, na diluição de 1:250, utilizando as mesmas condições de imobilização da rNS1. Posteriormente, o eletrodo foi lavado com tampão HBS-EP pH 7,4 para remover o excesso de material não ligado e seco com N<sub>2(g)</sub>.

Medidas de EIE foram realizadas nas condições descritas na Seção 2.1 para monitorar a interação antígeno-anticorpo. Diante dos resultados obtidos nesta etapa, escolheu-se a melhor plataforma para as etapas de otimização e validação do imunossensor impedimétrico.

## 2.6 – Estudos de otimização do imunossensor

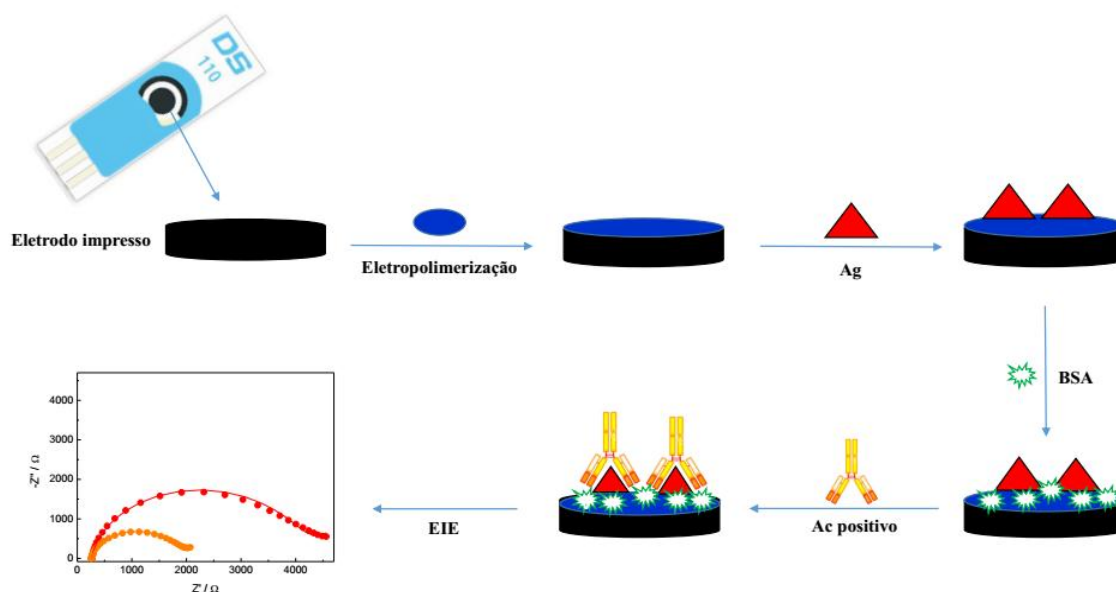
Para a etapa de formação dos filmes poliméricos investigou-se a quantidade de ciclos de potencial e a velocidade de varredura. O número de ciclos de potencial foi avaliado em 5, 10, 15, 20 e 30 ciclos mantendo-se a velocidade de varredura constante em 50 mV/s. A velocidade de varredura foi investigada em 10, 25, 50, 75, 100, 150 e 200 mV/s mantendo-se 10 ciclos de potencial.

Na etapa de imobilização do antígeno, foi avaliada a concentração de rNS1 adicionada na superfície do EIG modificado com poli(4-ABA), denominado poli(4-ABA)/EIG. Neste estudo, utilizou-se amostras de soro de camundongos imunizados por serem amostras melhor caracterizadas. Os soros foram usados para preparar um pool de soro de animais imunizados e outro com animais não imunizados. Soluções de rNS1 em concentrações de 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 5,0; 25 e 50 ng/mL foram preparadas em solução tampão HBS-EP pH 7,4. Então, adicionou-se 30 µL de cada solução à superfície do poli(4-ABA)/EIG onde foram mantidos a 37 °C durante 20 min. Em seguida, os eletrodos foram lavados com solução tampão HBS-EP pH 7,4 e secos com N<sub>2(g)</sub>. Após este procedimento, 30 µL de solução de BSA 1% foi adicionada sobre a superfície do imunossensor durante 30 min a temperatura ambiente, os eletrodos foram então novamente lavados com solução tampão HBS-EP pH 7,4 e secos com N<sub>2(g)</sub>. Para análise com os anticorpos específicos, 30 µL da amostra do soro foi adicionada sobre a superfície do imunossensor, mantendo-se o mesmo a 37 °C durante 20 min. O processo global de fabricação do imunossensor é apresentado no Esquema 1.

Após a otimização da concentração da rNS1, fixou-se este parâmetro e otimizou-se o seu tempo de imobilização (5, 10, 20, 30, 60 e 120 min). Posteriormente, o tempo de contato do imunossensor com o BSA também foi investigado em 0, 1, 3, 5, 15, 30, 45, 60 e 120 min.

Para análise da sensibilidade, amostras de soro de camundongos imunizados foram utilizadas em diferentes diluições (1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 e 1:1280) em tampão HBS-EP a pH 7,4. Para cada fator de diluição, utilizou-se as mesmas condições de imobilização descritas anteriormente.

**Esquema 1.** Protocolo de fabricação do imunossensor impedimétrico.



O tempo de análise, ou seja, contato da amostra com o imunossensor foi investigado por diferentes períodos (5, 10, 20, 30, 60 e 120 min). Todas as medidas das etapas de otimização foram obtidas em triplicata.

## 2.7 – Estudos de interferentes, estabilidade, reprodutibilidade, repetibilidade e validação

A seletividade é um fator importante para avaliar o desempenho de um imunossensor, portanto, para os experimentos de seletividade, diferentes interferentes incluindo glicose, ácido úrico, tampão HBS-EP e água deionizada foram investigados seguindo o mesmo protocolo do item 2.6, porém, em condições otimizadas.

Para o estudo de reprodutibilidade do imunossensor, cinco diferentes eletrodos modificados foram testados. Os eletrodos preparados foram incubados com solução de antígeno rNS1 (0,1 ng/mL) por 20 min a 37 °C. Logo após os eletrodos foram lavados com tampão HBS-EP pH 7,4 para remover qualquer adsorção não específica. Posteriormente, adicionou-se BSA 1% na superfície do eletrodo por 5 min e, por fim, incubou-se os eletrodos com os anticorpos anti-NS1 em diluição de 1:1280 por 30 min a 37 °C. Lavou-se novamente a superfície dos eletrodos com tampão HBS-EP pH 7,4.

A estabilidade do imunossensor foi avaliada realizando-se experimentos em intervalos de 5 dias em um período de 45 dias. Este teste foi realizado através da imobilização do antígeno rNS1 em três eletrodos que foram armazenados a 4,0 °C.

Para validar a confiabilidade analítica do imunossensor fabricado, foram realizadas análises de amostras de soro de coelho identificadas para os quatro sorotipos da Dengue, em diluição de 1:1280 em tampão HBS-EP pH 7,4.

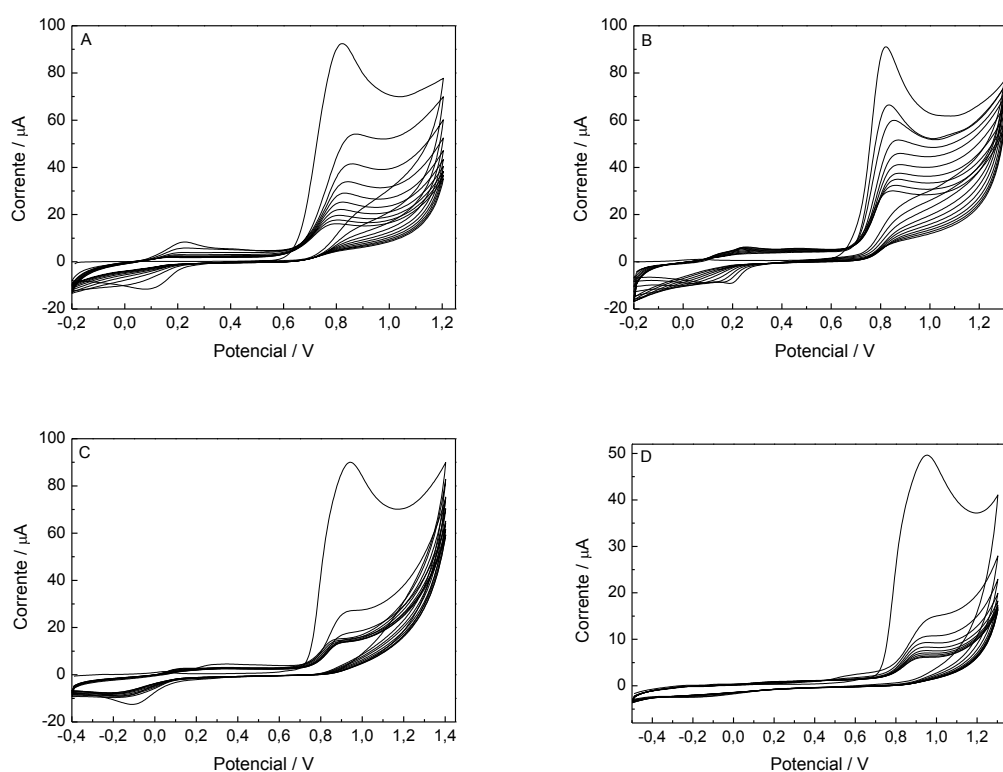
Em outro experimento, um conjunto de amostras de soro humano foi testado através do método ELISA. Aleatoriamente, foram escolhidas quatro amostras positivas deste conjunto e testadas com o kit da Bioclin<sup>®</sup> para Dengue NS1. Neste procedimento, colocou-se 100 µL da amostra de soro humano em cada um dos 4 dispositivos e aguardou-se 15 min para fazer a leitura do resultado. Posteriormente, estas mesmas amostras foram diluídas na proporção de 1:1280 em tampão HBS-EP pH 7,4 para a detecção de anticorpos anti-NS1 no imunossensor proposto.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 - Caracterização eletroquímica de transdutores

Os voltamogramas cíclicos relacionados à eletropolimerização do 4-ABA, 4-ABZ, 4-HBA e 4-HBZ utilizando EIG são mostrados na Figura 1. Durante o primeiro ciclo de potencial, pode-se observar um pico irreversível correspondente à oxidação do grupo amino do 4-ABA e da 4-ABZ em +0,82V e do grupo hidroxila do 4-HBA e da 4-HBZ em +0,95 V, indicando a formação dos cátions radicais, necessários para iniciar o processo de polimerização. Além disto, nota-se o aparecimento de um par redox próximo ao potencial de 0,0 V para todos os casos. Mas, para o poli(4-HBZ), este par redox aparece com correntes muito baixas quando comparados aos demais.

**Figura 1:** VCs obtidos para os EIG em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 M contendo 2,5 mM de: (A) 4-ABA, (B) 4-ABZ, (C) 4-HBA e (D) 4-HBZ. Ciclos = 10;  $\nu = 50$  mV/s.



O perfil dos voltamogramas da Figura 1 é similar aos obtidos por Santos e colaboradores (2019) sobre EG. Contudo, uma menor eletroatividade relacionada aos filmes poliméricos é observada nos EIG quando comparados aos resultados reportados para o EG.

Sendo possível sugerir que os filmes formados sob os EIG possuem as mesmas características que aqueles formados sob os EG (SANTOS, PIMENTA, THOMASINI *et al.*, 2019).

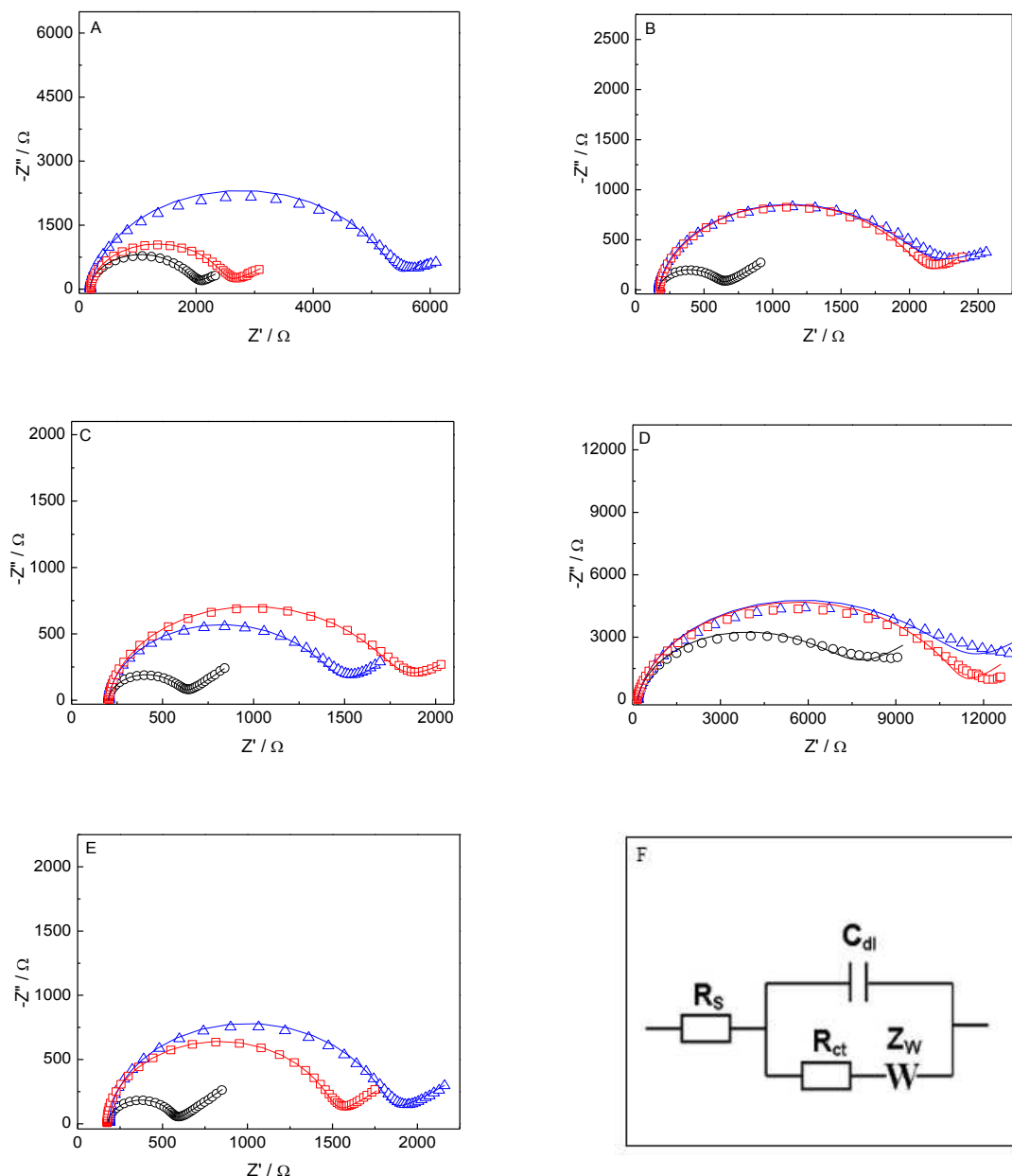
### **3.2 – Comportamento eletroquímico dos transdutores na imobilização da rNS1 e reconhecimento de anticorpos específicos e reações inespecíficas**

A EIE é uma técnica poderosa e eficaz para estudar as propriedades de interface de eletrodos que têm sua superfície modificada, além de monitorar as interações entre biomoléculas que ocorrem na superfície de um eletrodo (FENG, WU, WANG *et al.*, 2012; MUTREJA, JARIYAL, PATHANIA *et al.*, 2016; PRODROMIDIS, 2010). O espectro típico de impedância é apresentado na forma do diagrama de Nyquist, que é composto de uma parte semicircular em frequências mais altas e de uma parte linear em frequências mais baixas para sistemas controlados por difusão. O diâmetro do semicírculo no espectro de impedância pode ser quantificado como a resistência à transferência de carga ( $R_{ct}$ ). Esta resistência controla a cinética de transferência de elétrons da sonda redox na interface do eletrodo. Portanto, a  $R_{ct}$  pode variar de acordo com diferentes substâncias adsorvidas na superfície de eletrodos. Desta forma, utilizou-se neste trabalho as alterações na resistência à transferência de carga para monitorar a imobilização do antígeno e interação com anticorpos específicos e reações não específicas do EIG.

Estudos da imobilização da proteína rNS1 por adsorção física foram conduzidos nos quatro transdutores preparados na Seção 2.3. Sendo assim, com o objetivo de avaliar o comportamento destas plataformas no desenvolvimento do imunossensor, realizou-se a imobilização da rNS1 e avaliou-se o comportamento do imunossensor frente às amostras de soro contendo anticorpos específicos e para reações inespecíficas para Dengue utilizando-se a EIE. Os resultados são mostrados na Figura 2.

A Figura 2 mostra os diagramas de Nyquist para os eletrodos não modificados e modificados com os respectivos filmes poliméricos após a etapa de imobilização, nos quais é possível avaliar que os melhores resultados foram obtidos para o eletrodo modificado com o poli(4-ABA) (Fig. 2A), uma vez que pode-se observar maior diferenciação entre os perfis de EIE do Ag e do Ag-Ac<sup>+</sup> e também entre o Ag-Ac<sup>-</sup> e Ag-Ac<sup>+</sup>.

**Figura 2:** Diagrama de Nyquist obtido em solução de  $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$  5,0 mM contendo KCl 0,1 M para: A) poli(4-ABA)/EIG, B) poli(4-ABZ)/EIG, C) poli(4-HBA)/EIG, D) poli(4-HBZ)/EIG e E) EIG. Onde: (o) = Ag (antígeno); ( $\square$ ) = Ag-Ac<sup>-</sup> (interação antígeno com amostra não específica) e ( $\Delta$ ) = Ag-Ac<sup>+</sup> (interação antígeno com anticorpo específico). [rNS1] = 1,0 ng/mL. Diluição dos soros: 1/250. Amplitude: 10 mV. Faixa de frequência: 100 kHz a 10 mHz. As linhas sólidas representam a simulação de dados experimentais utilizando-se um circuito de Randles (F).



A análise dos espectros de impedância da Figura 2 foi realizada a partir da simulação dos dados experimentais utilizando o circuito de Randles (Fig. 2F), cujos valores de resistência à transferência de carga ( $R_{ct}$ ) encontrados estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1:** Valores de  $R_{ct}$  ( $\Omega$ ) obtidos a partir da simulação de EIE para o EIG e os eletrodos modificados com a rNS1 (Ag), assim como para a interação do imunossensor com anticorpos específicos ( $Ac^+$ ) e amostras inespecíficas ( $Ac^-$ ).

Plataforma	Ag	Ag- $Ac^-$	Ag- $Ac^+$
EIG	$385 \pm 2$	$1300 \pm 3$	$1590 \pm 4$
Poli(4-ABA)/EIG	$1673 \pm 4$	$2200 \pm 6$	$5120 \pm 5$
Poli(4-ABZ)/EIG	$431 \pm 3$	$1860 \pm 4$	$1710 \pm 3$
Poli(4-HBA)/EIG	$390 \pm 2$	$1510 \pm 3$	$1200 \pm 2$
Poli(4-HBZ)/EIG	$6920 \pm 5$	$10900 \pm 7$	$10700 \pm 6$

Verifica-se na Tabela 1 que o poli(4-ABA) apresentou os melhores resultados no reconhecimento dos alvos, uma vez que o valor de  $R_{ct}$  encontrado para a imunorreação Ag- $Ac^+$  é 200% maior do que o valor de  $R_{ct}$  do Ag, visto que são anticorpos específicos para a rNS1, enquanto o valor de  $R_{ct}$  encontrado para a reação não específica (Ag- $Ac^-$ ) mostra um aumento de somente 32%. Analisando os valores de  $R_{ct}$  obtidos para o Ag- $Ac^+$  e para o Ag- $Ac^-$ , observa-se uma diferença de 132% entre eles, demonstrando que o imunossensor fabricado é capaz de diferenciar entre os anticorpos específicos e reações não específicas, além de mostrar uma alta sensibilidade do sistema proposto.

A Figura 2E mostra os diagramas de Nyquist para a imobilização da rNS1 no EIG (sem modificação), e interação com amostras de soro específicas e não específicas. Da mesma forma, verifica-se um aumento nos valores de  $R_{ct}$  para o Ag- $Ac^+$  e para o Ag- $Ac^-$  em relação ao Ag. Contudo, o aumento nos valores de  $R_{ct}$  pode estar relacionado com adsorções não específicas dos anticorpos ( $Ac^+$  e/ou  $Ac^-$ ) ou outras proteínas presentes na amostra do soro diretamente sobre a superfície do EIG, e não ser resultado da interação específica antígeno-anticorpo, uma vez que o sinal do sistema Ag- $Ac^-$  é próximo ao do Ag- $Ac^+$  (22% de diferença).

Desta forma, observa-se um aumento de 334% do rNS1/EIG para o rNS1/poli(4-ABA)/EIG e de aproximadamente 220% do  $Ac^+$ /rNS1/EIG para o  $Ac^+$ /rNS1/poli(4-ABA)/EIG, isto mostra que a presença do filme polimérico influencia diretamente no sinal analítico medido, resultando em um maior valor de  $R_{ct}$  e maior diferença entre amostras específicas e inespecíficas, o que pode estar associado à forte adsorção das biomoléculas na superfície do transdutor, evidenciando a importância da presença do filme polimérico depositado na superfície do eletrodo. Portanto, a funcionalização da superfície de um eletrodo pela introdução de grupos reativos é uma etapa importante para obter um imunossensor com



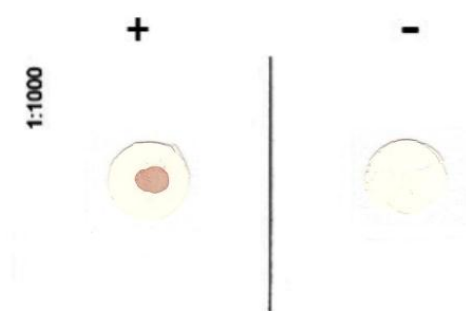
alto desempenho. Pela pouca diferenciação no sistema entre as amostras específicas e inespecíficas no EIG, na diluição utilizada (1/250), uma baixa sensibilidade do imunossensor pode ser esperada na plataforma sem o filme polimérico, o que poderia ocasionar ainda problemas de falso positivos nas análises.

Os resultados obtidos neste trabalho relacionados à imobilização da rNS1 e reconhecimento de anticorpos específicos da dengue sob EIG apresentaram maior sensibilidade para a plataforma de poli(4-ABA), e estão em acordo com os estudos iniciais conduzidos por Santos e colaboradores (SANTOS, PIMENTA, THOMASINI *et al.*, 2019) sobre EG. Desta forma, a plataforma escolhida para os estudos de otimização e desenvolvimento do imunossensor foi a poli(4-ABA)/EIG.

### 3.3 – Caracterização das amostras de soro de camundongos por dot blot

Previamente, antes da imobilização da rNS1, as amostras de soro de camundongos (5 positivas e 4 negativas) foram testadas por dot blot. Todas as amostras analisadas mostraram-se funcionais quanto a proteína rNS1 utilizada no teste. A melhor diluição do soro testado foi de 1:1000, pois em diluições do soro  $<1:500$  reações inespecíficas podem ser observadas. Sendo assim, na diluição de 1:1000, a coloração dos “dots” apresentou forte discriminação entre amostras positivas e negativas, conforme mostra a Figura 3.

**Figura 3:** Dot blot de soros positivos e negativos de camundongos na diluição de 1:1000 revelados com 3,3'-diaminobenzidina/peróxido de hidrogênio.



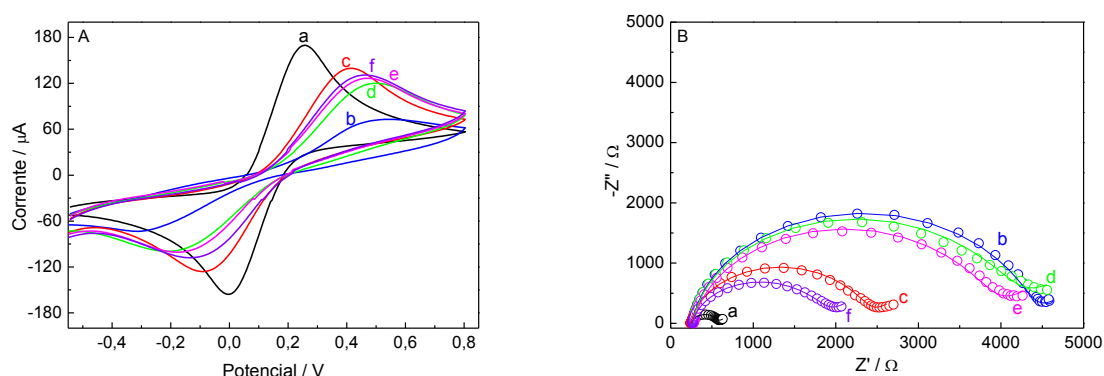
Então, estas amostras de soro de camundongos imunizados foram utilizadas para todos os testes de avaliação das plataformas e otimização do imunossensor, uma vez que se garantiu pelo teste realizado os controles positivos e negativos.

### 3.4 – Caracterização eletroquímica do imunossensor

Cada etapa do processo de fabricação do imunossensor foi caracterizado por VC e EIE para registrar as alterações do comportamento eletroquímico. A Figura 4 mostra os resultados obtidos.

A Figura 4A mostra que o EIG apresenta uma maior corrente de pico (curva a) entre as medidas realizadas, em contrapartida, ele apresenta um semicírculo muito pequeno representado pelo diagrama de Nyquist na Figura 3B (curva a), indicando uma baixa resistência à transferência de elétrons para a sonda redox.

**Figura 4:** (A) VCs em  $\nu = 100$  mV/s e (B) Diagramas de Nyquist obtidos em  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  5,0 mM contendo KCl 0,1 M para: (a) EIG, (b) poli(4-ABA)/EIG, (c) rNS1/poli(4-ABA)/EIG, (d) BSA/rNS1/poli(4-ABA)/EIG, (e)  $\text{Ac}^+$ /rNS1/poli(4-ABA)/EIG e (f)  $\text{Ac}^+$ /BSA/rNS1/poli(4-ABA)/EIG.



O poli(4ABA)/EIG mostra alterações na cinética de transferência de elétrons do par  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ , provocando uma diminuição nas correntes de pico (Fig. 4A, curva b). Tal comportamento pode estar relacionado à baixa condutividade do material adsorvido na superfície do eletrodo, o que resulta num aumento da  $R_{ct}$  (Fig. 4B, curva b). Outra hipótese para o decréscimo nos valores de corrente pode estar atribuída à formação de um filme carregado negativamente sobre a superfície do eletrodo, conforme estrutura do filme polimérico proposta por Santos e colaboradores (2019) o que repele o par redox, resultando no aumento da resistência à transferência de carga (SANTOS, PIMENTA, THOMASINI *et al.*, 2019).

Após a etapa de imobilização da rNS1 e logo após a incubação com os anticorpos específicos anti-NS1, observa-se que as correntes faradáicas diminuem em relação ao valor da corrente de pico do EIG, o que pode estar relacionado a um bloqueio na interface eletrodo/solução, causado pela adsorção do antígeno (Fig. 4A, curva c), e posteriormente, pela

adsorção de outra camada de anticorpos específicos (Fig. 4A, curva e), consequentemente, observou-se um aumento nos valores de  $R_{ct}$  após as etapas de imobilização quando comparado ao valor de  $R_{ct}$  para o EIG, conforme apresentado na Tabela 2.

**Tabela 2:** Valores da corrente de pico obtidos por VC e  $R_{ct}$  obtidos por EIE em cada etapa de construção do imunossensor.

<b>Etapas</b>	<b>Corrente de pico (<math>\mu A</math>)</b>	<b>Valores de <math>R_{ct}</math> (<math>\Omega</math>)</b>
EIG	$169 \pm 2$	$311 \pm 3$
Poli(4-ABA)/EIG	$71 \pm 2$	$4070 \pm 5$
rNS1/poli(4-ABA)/EIG	$140 \pm 3$	$2110 \pm 4$
Ac <sup>+</sup> /rNS1/poli(4-ABA)/EIG	$126 \pm 3$	$3560 \pm 5$
BSA/rNS1/poli(4-ABA)/EIG	$120 \pm 2$	$3820 \pm 6$
Ac <sup>+</sup> /BSA/rNS1/poli(4-ABA)/EIG	$130 \pm 3$	$1590 \pm 4$

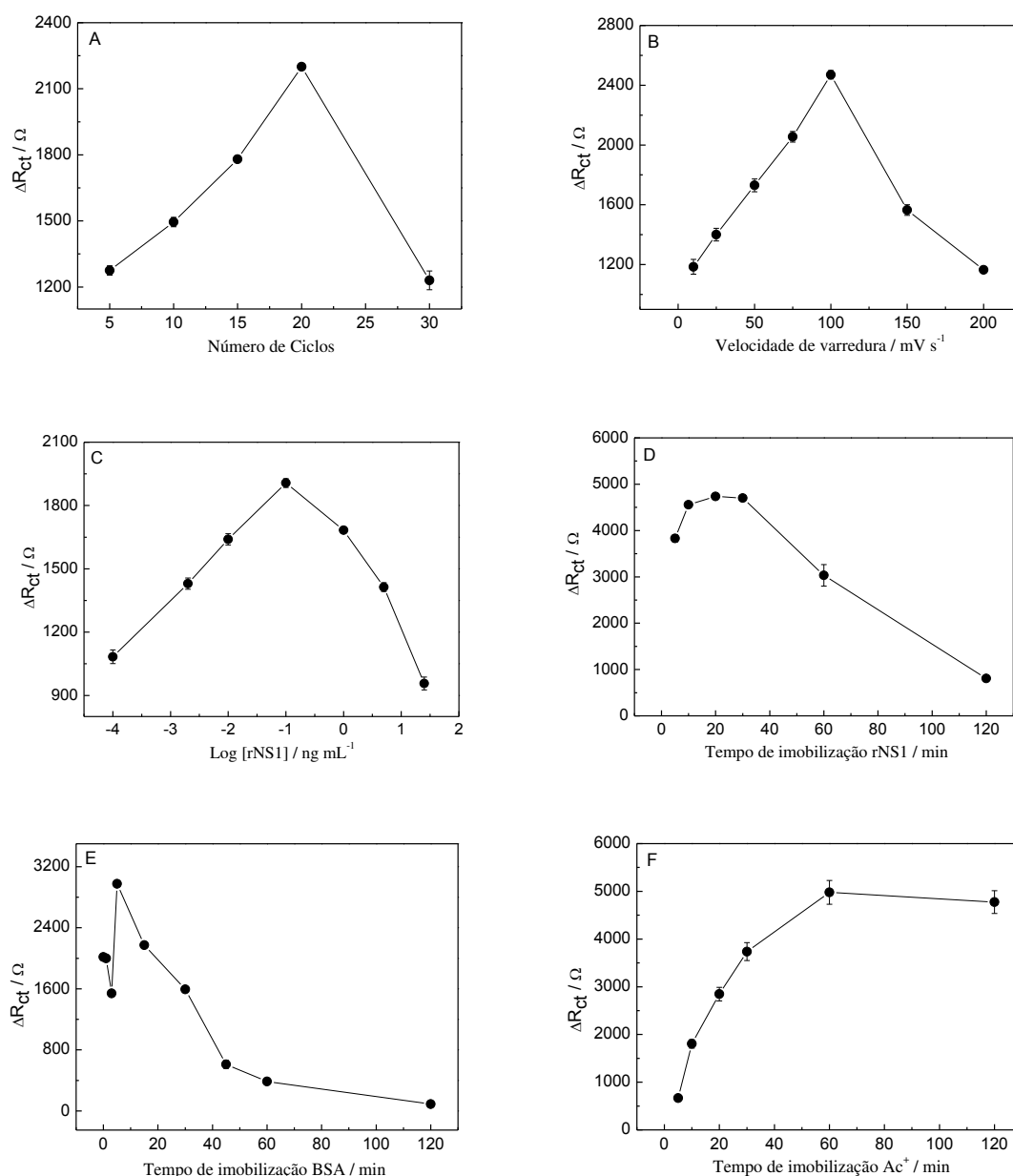
O BSA tem um papel importante na etapa de construção do imunossensor, ele é uma proteína inerte que bloqueia sítios reativos na superfície de um eletrodo, exceto o analito. Desta forma, observa-se para o rNS1/poli(4-ABA)/EIG um aumento de 69% nos valores de  $R_{ct}$  na presença dos anticorpos específicos (Ac<sup>+</sup>/rNS1/poli(4-ABA)/EIG). Os valores de  $R_{ct}$  para o BSA/rNS1/poli(4-ABA)/EIG se aproximam daqueles obtidos para o Ac<sup>+</sup>/rNS1/poli(4-ABA)/EIG. Contudo, após a interação do BSA/rNS1/poli(4-ABA)/EIG com os anticorpos específicos da Dengue observou-se uma diminuição significativa ( $\approx 58\%$ ) nos valores de  $R_{ct}$ . Acredita-se que a diminuição no valor de  $R_{ct}$  pode estar relacionada a dois fatores: i) como a superfície do eletrodo é funcionalizada, pode estar havendo interações inespecíficas entre a superfície do eletrodo e os Ac<sup>+</sup>; ii) após interação com Ac<sup>+</sup> a superfície do eletrodo adquire um caráter catiônico que atrai o par redox, diminuindo a resistência do sistema. Tal comportamento no decréscimo nos valores de  $R_{ct}$  para interação Ag-Ac<sup>+</sup> também foi observado por Pimenta e colaboradores (2018) em estudos semelhantes ao investigado neste trabalho (PIMENTA, SANTOS, THOMASINI *et al.*, 2018).

### 3.5 – Estudos de otimização

Uma série de condições do imunossensor, tais como número de ciclos, velocidade de varredura, concentração da rNS1 e tempo de incubação foram otimizadas. Para todas as

otimizações, calculou-se a média ( $n = 3$ ) da diferença dos valores obtidos de  $R_{ct}$  entre o Ag e Ag-Ac<sup>+</sup>. Os resultados das otimizações estão apresentados na Figura 5.

**Figura 5:**  $\Delta R_{ct}$  em função de: (A) número de ciclos de potencial, (B) velocidade de varredura, (C) concentração de rNS1, (D) tempo de incubação de rNS1, (E) tempo de incubação do BSA e (F) tempo de reação com Ac<sup>+</sup>.



Observa-se nas Figuras 5A e 5B que o valor de  $\Delta R_{ct}$  aumentou juntamente com o aumento do número de ciclos de 5 para 20 ciclos e da velocidade de varredura de 10 para 100 mV/s, e então o valor de  $\Delta R_{ct}$  diminuiu com o aumento do número de ciclos e da velocidade de varredura, respectivamente. Sendo assim, os resultados indicaram que as melhores condições

para reconhecimentos dos alvos específicos foram obtidas com 20 ciclos de potencial a 100 mV/s.

Na etapa de imobilização da rNS1, várias concentrações do antígeno foram testadas antes de realizar a detecção dos anticorpos anti-NS1, uma vez que a concentração do antígeno tem maior influência no desempenho do dispositivo, especialmente em termos de seletividade e sensibilidade. Observa-se na Figura 5C que o valor de  $\Delta R_{ct}$  aumentou com o aumento da concentração da rNS1 até 0,1 ng/mL, a partir desta concentração houve uma diminuição nos valores de  $\Delta R_{ct}$ . Assim, a concentração de 0,1 ng/mL de rNS1 foi utilizada.

Na análise da influência do tempo de imobilização da rNS1 (Fig. 5D) observou-se que os valores de  $\Delta R_{ct}$  aumentaram até 15 min mantendo-se constante até 30 min, após este tempo, os valores de  $\Delta R_{ct}$  diminuíram bruscamente com o aumento do tempo de incubação. Portanto, 20 min foi selecionado como o tempo de imobilização do antígeno.

O tempo de imobilização do BSA também foi monitorado (Fig. 5E), onde observou-se que o valor de  $\Delta R_{ct}$  para o tempo de 0 e 1 min é praticamente igual, sendo que este valor diminuiu para o tempo de 3 min e depois aumentou com o aumento do tempo de reação até 5 min, logo após o valor de  $\Delta R_{ct}$  diminuiu até o tempo de 120 min. Desta forma, 5 min foram definidos como a condição ótima.

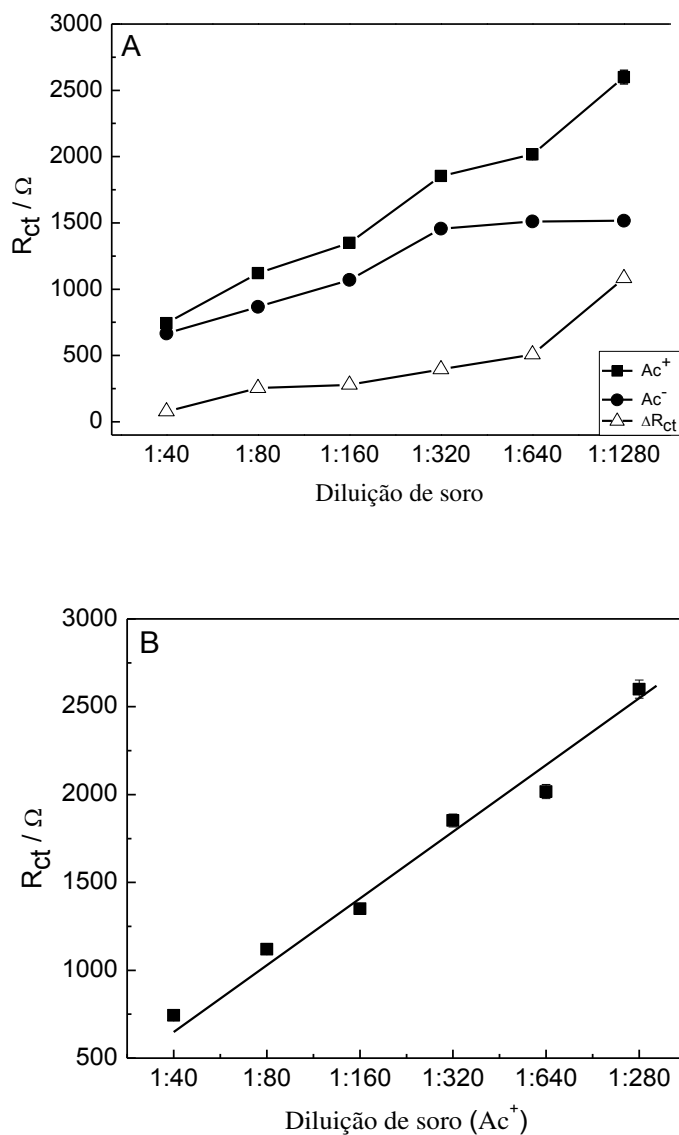
Estudos do efeito do tempo de reação com  $Ac^+$  (Fig. 5F) mostraram que o valor de  $\Delta R_{ct}$  do imunossensor aumentou com o tempo de incubação atingindo um patamar a 60 min, e então o valor de  $\Delta R_{ct}$  quase não mudou após este tempo. Porém, definiu-se o tempo de 30 min de reação como ótimo, uma vez que a quantidade de solução colocada na superfície do eletrodo em tempo superior secava totalmente.

### 3.6 – Desempenho analítico do imunossensor

A Figura 6 mostra o desempenho analítico do imunossensor utilizando um pool de diferentes diluições dos soros (1:40 a 1:1280) contendo anticorpos específicos e para amostras inespecíficas.

A Figura 6A mostra que os valores de  $R_{ct}$  para o  $Ac^+$  aumentaram conforme a diluição aumentou, porém o aumento na resposta das amostras inespecíficas ( $Ac^-$ ) foi acompanhado por um aumento menos evidente do que na resposta das amostras específicas. Observa-se ainda que a partir da diluição de 1:320, as amostras inespecíficas atingem a saturação, resultando em nenhuma alteração perceptível dos valores de  $R_{ct}$ .

**Figura 6:** (A) Valores de  $R_{ct}$  obtidos pelo imunossensor para amostras de soro de camundongos contendo anticorpos específicos e amostras inespecíficas. (B)  $R_{ct}$  em função do fator de diluição dos soros positivos de camundongos.



Na Figura 6B observa-se um aumento dos valores de  $R_{ct}$  com o aumento do fator de diluição. Assim, uma relação linear entre a resposta impedimétrica e a diluição das amostras de soro positivo foi obtida com a equação de regressão, cujo valor do coeficiente de correlação foi de 0,9782, indicando uma boa performance analítica nas condições analisadas.

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos para os valores de  $R_{ct}$  para as diluições de soro positivo e negativo e a diferença de  $R_{ct}$  ( $\Delta R_{ct}$ ).

**Tabela 3:** Valores de  $R_{ct}$  ( $\Omega$ ) obtidos a partir dos resultados de simulação de EIE para as diluições do soro positivo e negativo e os valores de  $\Delta R_{ct}$ .

Fator de diluição	Ag-Ac <sup>+</sup>	Ag-Ac <sup>-</sup>	$\Delta R_{ct}$
<b>1:40</b>	743	665	78
<b>1:80</b>	1120	867	253
<b>1:160</b>	1350	1070	280
<b>1:320</b>	1853	1457	396
<b>1:640</b>	2017	1510	507
<b>1:1280</b>	2600	1517	1083

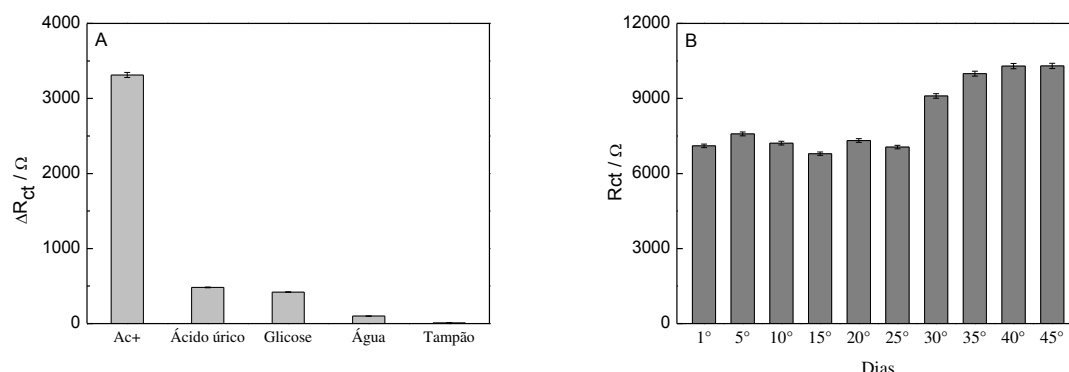
Pode-se verificar a partir da Tabela 3 que, para o fator de diluição de 1:40, a diferença entre as respostas foi de aproximadamente 10%. No entanto, para o fator de diluição de 1:1280, a diferenciação de sinal obtida entre as amostras específicas e não específicas foi de 70%. Estes resultados indicam que a diluição de 1:1280 é a ideal para a imobilização dos soros positivos e negativos nas condições analisadas.

### 3.7 – Estudos de seletividade, estabilidade e reprodutibilidade

A especificidade do analito é a base para a fabricação de um imunossensor, principalmente para a detecção de dengue, pois, em muitos protocolos de detecção, as leituras de falsos positivos e a interferência da reatividade cruzada de vários outros analitos são relatadas (DARWISH, NADIYA, ALRAWI, *et al.*, 2016).

Para avaliar a especificidade do imunossensor, alguns interferentes incluindo ácido úrico, glicose, água e tampão HBS-EP foram estudados usando o protocolo similar como no caso dos anticorpos anti-NS1. Como pode ser visto na Figura 7A, a resposta para todos estes analitos é irrelevante em comparação com a resposta do Ac<sup>+</sup>, uma vez que o valor de  $R_{ct}$  do Ac<sup>+</sup> (3313  $\Omega$ ) é aproximadamente oito vezes maior do que o da glicose (420  $\Omega$ ), por exemplo. Estes resultados podem indicar a ausência de quaisquer reações cruzadas durante a detecção de anticorpos anti-NS1 com alguns compostos comuns existentes nas amostras de sangue.

**Figura 7:** (A) Análise dos interferentes: ácido úrico, glicose, água e tampão HBS-EP em comparação às amostras de soro específicas da dengue. (B) Variação dos valores de  $R_{ct}$  do BSA/rNS1/poli(4-ABA)/EIG armazenado a 4,0 °C durante 45 dias.



A estabilidade do imunossensor proposto foi investigada por EIE. Após a imobilização do antígeno, o imunossensor foi armazenado a 4,0 °C durante 45 dias. Como pode ser visto na Figura 7B, o BSA/rNS1/poli(4-ABA)/EIG se mantém praticamente constante entre o 1° e 25° dia de armazenamento, e após um mês a resposta aumenta em torno de 28% em relação ao 1° dia e atinge um patamar. O imunossensor retém cerca de 82% de sua atividade após ser armazenado por 45 dias, isto sugere que o antígeno rNS1 imobilizado na superfície do eletrodo possui estabilidade de armazenamento aceitável.

A reprodutibilidade da resposta do imunossensor foi avaliada usando cinco eletrodos diferentes que foram preparados independentemente para detectar os anticorpos anti-NS1. Os resultados experimentais mostraram que não houve diferença significativa entre os valores de  $R_{ct}$  para os cinco eletrodos e um baixo desvio padrão relativo (DPR) de 0,97% foi obtido, indicando que o imunossensor proposto apresentou excelente reprodutibilidade entre os imunossensores. A reprodutibilidade do dispositivo também foi investigada por um analista diferente, que seguiu o mesmo protocolo de fabricação do imunossensor e foi obtida uma ótima reprodutibilidade (DPR = 0,86%), indicando que a metodologia desenvolvida pode ser útil para a aplicação ao diagnóstico da Dengue. O imunossensor também apresentou boa repetibilidade para 15 medidas consecutivas do mesmo eletrodo [BSA/rNS1/poli(4-ABA)/EIG], em triplicata, com um DPR de 1,27%. Estes resultados confirmam que o imunossensor fabricado pode ser uma alternativa para a detecção de Dengue, visto que se trata de uma situação emergencial, e que cada vez há uma maior necessidade de análise de um grande número de amostras e em curto espaço de tempo, devido aos numerosos casos suspeitos de dengue.

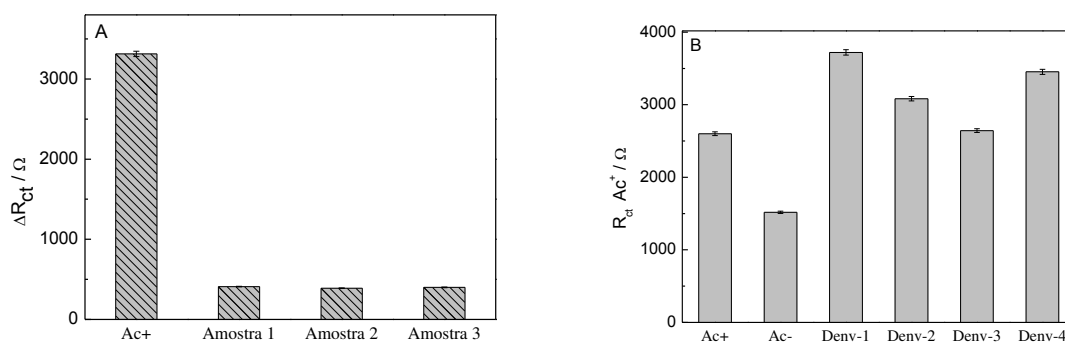


### 3.8 – Análise de espécimes biológicos

Com a finalidade de demonstrar a aplicação prática do imunossensor proposto, o mesmo foi utilizado para a detecção de anticorpos anti-NS1 em amostras reais de soro humano e em amostras de sangue, sob as condições otimizadas. O conjunto de amostras de sangue utilizado nesta etapa do trabalho consistiu em três amostras não específicas de diferentes indivíduos. A detecção dos anticorpos anti-NS1 foi realizada sem qualquer pré-tratamento, onde utilizou-se 1  $\mu$ L do sangue em diluição de 1:1280 de tampão HBS-EP pH 7,4. Os resultados da análise são mostrados na Figura 8A.

A comparação entre os valores de  $\Delta R_{ct}$  do anticorpo específico e das amostras de sangue mostra uma diferença significativa de mais de 700%, o que indica um ótimo resultado, mesmo quando se utiliza o antígeno bruto e amostras não processadas, pois mostra a capacidade de diferenciação do dispositivo para amostras de soro e amostras de sangue, visto que a segunda se trata de uma amostra biológica complexa.

**Figura 8:** (A) Resposta do imunossensor em relação à reação com amostras de sangue não específicas. (B) Resposta do imunossensor em relação à reação com amostras de soro de coelhos imunizados com os quatro sorotipos da Dengue.



Avaliou-se ainda o desempenho do imunossensor proposto através da detecção de anticorpos anti-NS1 em amostras de soro de coelhos imunizados com os quatro sorotipos principais da dengue. Pode ser visto na Figura 8B que foi possível identificar os 4 sorotipos do vírus da dengue através da análise das amostras de soro de coelho. Como resultado, os sorotipos da dengue apresentaram altos valores de  $R_{ct}$ , entretanto, o sorotipo do DENV-1 apresentou o maior valor, 43% maior do que o valor obtido para o anticorpo específico, o que representa uma forte interação do antígeno com os anticorpos anti-NS1 nativos presentes nas amostras sorológicas positivas.

Para validar o uso do imunossensor proposto na análise de amostras reais, o protocolo foi demonstrado com amostras de soro humano. Após a realização dos ensaios sorológicos (ELISA), diferentes soros foram testados para a presença do antígeno NS1 usando o teste rápido (Bioclin) e os diagnósticos foram confirmados através do método impedimétrico utilizado neste trabalho. Como a maioria das avaliações diagnósticas é baseada na detecção do antígeno NS1 presente no soro do paciente, avaliou-se a resposta imune de anticorpos contra o antígeno NS1, uma vez que este antígeno é encontrado do 1º ao 9º dias após o início da febre nas amostras de pacientes com infecção primária e secundária pelo vírus da Dengue. Entretanto, sua concentração reduz ao longo dos dias de infecção, diminuindo consideravelmente as chances de detecção do antígeno. Artigos relatam sensibilidade menor que 50% para detecção após o 4º dia de infecção por vários métodos de diagnóstico (ALCON, TALARMIN, DEBRUYNE *et al.*, 2002).

O teste da Bioclin-NS1 detecta qualitativamente a presença da proteína viral NS1 em amostras de sangue total, soro ou plasma. Contudo, apesar do teste não detectar os anticorpos anti-NS1, como o imunossensor proposto, o mesmo foi escolhido com base nos estudos de Sankar e colaboradores (2012), no qual os autores demonstraram que aqueles pacientes que são antígenos positivos para detecção de NS1 também são positivos para a detecção de anticorpos anti-NS1 (SANKAR, DHANANJEYAN, PARAMASIVAN *et al.*, 2012). Os resultados obtidos foram todos positivos para a metodologia imunocromatográfica utilizada no teste rápido e para a detecção impedimétrica de anticorpos anti-NS1. Assim, o imunossensor proposto e fabricado neste trabalho pode ser aplicado satisfatoriamente para o diagnóstico preciso das infecções pelo vírus da Dengue, apresentando excelente resultado para a metodologia de detecção de amostras de soro.

A Tabela 4 mostra os estudos presentes na literatura referentes ao diagnóstico da dengue em relação à superfície do transdutor, faixa de trabalho e limite de detecção. Em todos os casos, o princípio de funcionamento do dispositivo é baseado na detecção do antígeno NS1, apresentando uma considerável faixa de trabalho e baixos limites de detecção.

**Tabela 4:** Dados de comparação do desempenho de imunossensores eletroquímicos baseados em NS1 para o diagnóstico de Dengue relatados na literatura.

<b>Superfície do transdutor</b>	<b>Faixa de trabalho (ng/mL)</b>	<b>Limite de detecção (ng/mL)</b>	<b>Referência</b>
BSA/eletrodo impresso de carbono	1-200	0,3	(NAWAZ, HAYAT, CATANANTE <i>et al.</i> , 2018)
Eletrodo de fibra de carbono modificado com quitosana	1-175	0,94	(CAVALCANTI, SILVA, PERES <i>et al.</i> , 2012)
Eletrodo de ouro modificado	10-1000	30	(CECCHETTO, CARVALHO, SANTOS <i>et al.</i> , 2015)
Eletrodo impresso de nanotubos de carbono	40-2000	12	(DIAS, GOMES-FILHO, SILVA <i>et al.</i> , 2013)
Eletrodo baseado em chip de disco compacto	1-100	0,33	(CAVALCANTI, GUEDES, SOTOMAYOR <i>et al.</i> , 2012)
Eletrodo de ITO modificado com nanopartículas de ouro (AuNPs)	5-4000	5,0	(DARWISH, NADIYA, ALRAWI <i>et al.</i> , 2016)
SAM/eletrodo de ouro	1-5000	1,2	(SANTOS, BUENO e DAVIS, 2018)

Neste trabalho, foram analisadas amostras de soro nas quais a dosagem de anticorpos não foi realizada e, por isso, sua concentração não foi avaliada; portanto, apenas estudos de diluição de soros foram realizados, sem a quantificação de anticorpos. Desta forma, não foi possível calcular o limite de detecção e a faixa de trabalho para o sistema, dado que a análise é realizada pelo reconhecimento de anticorpos anti-NS1 presentes em amostras de soro humano. Logo, a finalidade deste trabalho foi desenvolver um imunossensor para a detecção do vírus da Dengue, que confirme de forma prática e rápida o diagnóstico da patologia.



#### 4. CONCLUSÃO

Um imunossensor eletroquímico específico para a detecção de anticorpos anti-NS1 foi desenvolvido. Eletrodos impressos de grafite foram funcionalizados com filme polimérico derivado do ácido 4-aminobenzóico. O antígeno rNS1 foi imobilizado sobre a superfície do eletrodo modificado e análises de detecção em amostras de soro contendo anticorpos específicos e também em amostras inespecíficas foram conduzidas. O número de ciclos de potencial (20 ciclos) e velocidade de varredura (100 mV/s) na etapa de formação do filme polimérico foram otimizados. A concentração de antígeno imobilizado (0,1 ng/mL), tempo de imobilização (20 min), tempo de proteção da superfície com BSA (5 min) e tempo de reação com os alvos (30 min) também foram parâmetros otimizados. A melhor diferenciação entre amostras de soro contendo anticorpos específicos e amostras inespecíficas foi obtida em diluições de 1:1280.

O imunossensor proposto apresentou alta seletividade diante dos interferentes como: ácido úrico, glicose, água e tampão HBS-EP, e boa estabilidade por um período de 45 dias de armazenamento a 4,0 °C. A reprodutibilidade do sistema foi investigada e um DPR de 0,97% ( $n = 5$ ) foi obtido para diferentes imunossensores preparados. Análises do protocolo de determinação realizadas por diferentes usuários ( $n = 3$ ) mostrou boa reprodutibilidade com DPR de 0,86%. Testes de repetibilidade ( $n = 15$ ) para o BSA/rNS1/poli(4-ABA)/EIG mostraram DPR de 1,27%.

A análise de validação foi realizada com amostras de soro humano, onde após os testes sorológicos (ELISA), diferentes soros foram testados para a presença do antígeno NS1 utilizando um teste rápido (Bioclin), e os diagnósticos foram confirmados pelo método impedimétrico utilizado neste trabalho.

Todos os resultados descritos neste estudo demonstram o potencial do poli(4-ABA)/EIG para a geração de uma interface imunossensora específica para a detecção de anticorpos anti-NS1 em amostras de soros humano para o diagnóstico da Dengue.



## REFERÊNCIAS

- ALCON, S.; TALARMIN, A.; DEBRUYNE, M.; FALCONAR, A. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 2, p. 376-381, 2002.
- BARKHAM, T. M.; CHUNG, Y. K.; TANG, K. F.; OOI, E. E. The performance of RT-PCR compared with a rapid serological assay for acute dengue fever in a diagnostic laboratory. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 2, p. 142-148, 2006.
- BEATTY, M. E.; STONE, A.; FITZSIMONS, D. W.; HANNA, J. N. Best practices in dengue surveillance: a report from the Asia-Pacific and Americas Dengue Prevention Boards. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 11, p. e890, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 12 de 2019 e Levantamento Rápido de Índices para Aedes aegypti (LIRAA). v. 50, n. 13. Abr. 2019. **Boletim Epidemiológico**. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/abril/30/2019-013-Monitoramento-doscasos-de-arboviroses-urbanas-transmitidas-pelo-Aedes-publicacao.pdf>. Acesso em: 30 jun. 2019.
- CAVALCANTI, I.; SILVA, B.; PERES, N.; MOURA, P. A disposable chitosan-modified carbon fiber electrode for dengue virus envelope protein detection. **Talanta**, v. 91, p. 41-46, 2012.
- CAVALCANTI, I. T.; GUEDES, M. I.; SOTOMAYOR, M. D.; YAMANAKA, H. A label-free immunosensor based on recordable compact disk chip for early diagnostic of the dengue virus infection. **Biochemical engineering journal**, v. 67, p. 225-230, 2012.
- CECCHETTO, J.; CARVALHO, F. C.; SANTOS, A.; FERNANDES, F. C. An impedimetric biosensor to test neat serum for dengue diagnosis. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 213, p. 150-154, 2015.
- DAI, Y.; CAI, Y.; ZHAO, Y.; WU, D. Sensitive sandwich electrochemical immunosensor for alpha fetoprotein based on prussian blue modified hydroxyapatite. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 28, n. 1, p. 112-116, 2011.
- DARWISH, N. T.; ALIAS, Y. B.; KHOR, S. M. An introduction to dengue-disease diagnostics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 67, p. 45-55, 2015.
- DARWISH, N. T.; ALRAWI, A. H.; SEKARAN, S. D.; ALIAS, Y. Electrochemical immunosensor based on antibody-nanoparticle hybrid for specific detection of the dengue virus NS1 biomarker. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 163, n. 3, p. B19-B25, 2016.

DASH, P. K.; PARIDA, M.; SANTHOSH, S.; SAXENA, P. Development and evaluation of a 1-step duplex reverse transcription polymerase chain reaction for differential diagnosis of chikungunya and dengue infection. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 62, n. 1, p. 52-57, 2008.

DIAS, A. C. M.; GOMES-FILHO, S. L.; SILVA, M. M.; DUTRA, R. F. A sensor tip based on carbon nanotube-ink printed electrode for the dengue virus NS1 protein. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 44, p. 216-221, 2013.

FENG, L.; WU, L.; WANG, J.; REN, J. Detection of a Prognostic Indicator in Early-Stage Cancer Using Functionalized Graphene-Based Peptide Sensors. **Advanced Materials**, v. 24, n. 1, p. 125-131, 2012.

GOWRI SANKAR, S.; DHANANJEYAN, K. J.; PARAMASIVAN, R.; THENMOZHI, V. Evaluation and use of NS1 IgM antibody detection for acute dengue virus diagnosis: report from an outbreak investigation. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 1, v. 18, n. 1, p. E8-E10, 2012.

GUZMAN, M. G.; GUBLER, D. J.; IZQUIERDO, A.; MARTINEZ, E. Dengue infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 16055, 2016.

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International journal of infectious diseases**, v. 8, n. 2, p. 69-80, 2004.

HUY, T. Q.; HANH, N. T. H.; THUY, N. T.; VAN CHUNG, P. A novel biosensor based on serum antibody immobilization for rapid detection of viral antigens. **Talanta**, v. 86, p. 271-277, 2011.

KRYSCIO, D. R.; PEPPAS, N. A. Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers. **Acta biomaterialia**, v. 8, n. 2, p. 461-473, 2012.

MUTREJA, R.; JARIYAL, M.; PATHANIA, P.; SHARMA, A. Novel surface antigen based impedimetric immunosensor for detection of Salmonella typhimurium in water and juice samples. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 85, p. 707-713, 2016.

NAWAZ, M. H.; HAYAT, A.; CATANANTE, G.; LATIF, U. Development of a portable and disposable NS1 based electrochemical immunosensor for early diagnosis of dengue virus. **Analytica chimica acta**, v. 1026, p. 1-7, 2018.

NORMILE, D. Surprising New Dengue Virus Throws a Spanner in Disease Control Efforts. **Science**, v. 342, n. 6157, p. 415-415, 2013.

PARKASH, O.; SHUEB, R. Diagnosis of dengue infection using conventional and biosensor based techniques. **Viruses**, v. 7, n. 10, p. 5410-5427, 2015.

PIMENTA, T. C.; SANTOS, C. C.; THOMASINI, R. L.; FERREIRA, L. F. Impedimetric immunosensor for dengue diagnosis using graphite screen-printed electrodes coated with poly (4-aminophenylacetic acid). **Biomedical microdevices**, v. 20, n. 3, p. 78, 2018.



PRODROMIDIS, M. I. Impedimetric immunosensors - A review. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 14, p. 4227-4233, 2010.

RAENGSAKULRACH, B.; NISALAK, A.; MANEEKARN, N.; YENCHITSOMANUS, P.-T. Comparison of four reverse transcription-polymerase chain reaction procedures for the detection of dengue virus in clinical specimens. **Journal of virological methods**, v. 105, n. 2, p. 219-232, 2002.

SAMUEL, P. P.; TYAGI, B. Diagnostic methods for detection & isolation of dengue viruses from vector mosquitoes. **Indian journal of medical research**, v. 123, n. 5, p. 615, 2006.

SANTOS, A.; BUENO, P. R.; DAVIS, J. J. A dual marker label free electrochemical assay for Flavivirus dengue diagnosis. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 100, p. 519-525, 2018.

SANTOS, C. C.; PIMENTA, T. C.; THOMASINI, R. L.; VERLY, R. M. Electropolymerization of phenol and aniline derivatives: Synthesis, characterization and application as electrochemical transducers. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 846, p. 113163, 2019.

SINAWANG, P. D.; RAI, V.; IONESCU, R. E.; MARKS, R. S. Electrochemical lateral flow immunosensor for detection and quantification of dengue NS1 protein. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 77, p. 400-408, 2016.

SINGHI, S.; KISSOON, N.; BANSAL, A. Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intensive care unit. **Jornal de pediatria**, v. 83, n. 2, p. S22-S35, 2007.

SUWANDONO, A.; KOSASIH, H.; KUSRIASTUTI, R.; HARUN, S. Four dengue virus serotypes found circulating during an outbreak of dengue fever and dengue haemorrhagic fever in Jakarta, Indonesia, during 2004. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 9, p. 855-862, 2006.

TELES, F. S. R. R. Biosensors and rapid diagnostic tests on the frontier between analytical and clinical chemistry for biomolecular diagnosis of dengue disease: a review. **Analytica chimica acta**, v. 687, n. 1, p. 28-42, 2011.

WATTHANAWORAWIT, W.; TURNER, P.; TURNER, C. L.; TANGANUCHITCHARNCHAI, A. A prospective evaluation of diagnostic methodologies for the acute diagnosis of dengue virus infection on the Thailand-Myanmar border. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 1, p. 32-37, 2011.

WHO. World Health Organization, **Dengue and severe dengue**. 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. Acesso em: 30 jun. 2019.

YAMADA, K.-I.; TAKASAKI, T.; NAWA, M.; KURANE, I. Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. **Journal of Clinical Virology**, v. 24, n. 3, p. 203-209, 2002.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na primeira parte deste trabalho foram desenvolvidas plataformas eletroquímicas derivadas de fenol e anilina. A voltametria cíclica foi empregada para sintetizar os filmes derivados do 4-ABA, 4-ABZ, 4-HBA e 4-HBZ em eletrodos de grafite. Os eletrodos modificados apresentaram picos redox bem definidos, indicando a eletrodeposição de material eletroativo.

As análises por FTIR e RMN mostraram a presença da ligação C-O-C para o poli(4-HBA) e poli(4-HBZ), sugerindo que a polimerização começa através do grupo hidroxila fenólico. Da mesma forma, para o poli(4-ABA) e poli(4-ABZ) a polimerização ocorre através do grupo amino ligado ao anel, resultando na ligação C-N-C. Em todos os casos, os grupos carboxila e amida foram preservados nos polímeros.

Na etapa de imobilização, utilizou-se a adsorção física por ser uma técnica simples e eficiente. Entre os polímeros formados, o poli(4-ABA) e o poli(4-HBA) produziram uma matriz mais eficiente para a imobilização do antígeno rNS1 e dos anticorpos específicos para a dengue.

Desta forma, na segunda parte deste trabalho, um imunossensor eletroquímico específico para a detecção de anticorpos anti-NS1 foi desenvolvido com êxito, utilizando eletrodos impressos em tela de grafite modificados com poli(4-ABA).

Estes resultados demonstram grande potencial do dispositivo desenvolvido para a aplicação em diagnósticos clínicos da Dengue, principalmente para aquelas regiões que necessitam de investimentos laboratoriais e mão de obra especializada para a realização dos exames de confirmação da doença.